

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): SHIMOKAWATOKO, Yasutaka; NISHIO, Shoichi

Application No.:

Group:

Filed: April 9, 1999

Examiner:

For: A METHOD FOR EVALUATING THE ABILITY OF A COMPOUND TO  
INHIBIT THE PROTOPORPHYRINOGEN OXIDASE ACTIVITY

JC612 U.S. PRO  
09/289180  
04/09/99

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents  
Box Patent Application  
Washington, D.C. 20231

April 9, 1999  
2185-0324P-SP

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the applicant hereby claims the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	10-099619	04/10/98

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By: 

GERALD M. MURPHY, JR.

Reg. No. 28,977

P. O. Box 747

Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment  
(703) 205-8000  
/sas

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

2185-324P  
1071  
CG612 U.S. PTO  
09/289180  
04/09/99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 4月10日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第099619号

願人  
Applicant(s):

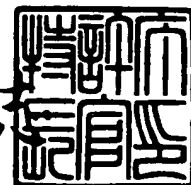
住友化学工業株式会社

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

1999年 3月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山佐平



出証番号 出証特平11-3015368

Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 P148946

【提出日】 平成10年 4月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/26  
C12N 15/53

【発明の名称】 プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能評価  
方法

【請求項の数】 27

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会  
社内

    【氏名】 下川床 康孝

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会  
社内

    【氏名】 西尾 昌一

【特許出願人】

    【識別番号】 000002093

    【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

    【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

    【識別番号】 100093285

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 久保山 隆

    【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

    【識別番号】 100094477

    【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能評価方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】

化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を評価する方法であって、

(1) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に基づく増殖能の欠損した宿主細胞に、宿主細胞内で機能可能なプロモーター、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子、および宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなるDNA断片が導入されてなり、前記DNA断片に在するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を発現する形質転換体を、

被験化合物の存在下及び非存在下に、プロトヘムまたはその誘導体を含まない培地で培養して各条件下における該形質転換体の増殖度を測定する工程、

(2) 該増殖度の差異に基づき被験化合物の接触による前記形質転換体の増殖阻害度を求め、被験化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を判定する工程、

を含むことを特徴とする化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能の評価方法。

【請求項2】

化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を評価する方法であって、

(1) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に基づく増殖能の欠損した宿主細胞に、

(a) 宿主細胞内で機能可能でありかつ転写活性が制御されうるプロモーター、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子、および宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなるDNA断片、および

(b) 該DNA断片のプロモーターの転写活性を制御可能な遺伝子、該遺伝子により転写活性を制御されずかつ宿主細胞内で機能可能なプロモーターおよび宿主

細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなるDNA断片

が導入されてなり、(a)のDNA断片に在するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を発現する形質転換体を、

被験化合物の存在下及び非存在下に、プロトヘムまたはその誘導体を含まない培地で培養して各条件下における該形質転換体の増殖度を測定する工程、

(2) 該増殖度の差異に基づき被験化合物の接触による前記形質転換体の増殖阻害度を求め、被験化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を判定する工程、

を含むことを特徴とする化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能の評価方法。

#### 【請求項3】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が動物または植物に由来するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子である請求項1または2記載の化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能の評価方法。

#### 【請求項4】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子がラットまたはコナミドリムシに由来するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子である請求項1～3記載の化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能の評価方法。

#### 【請求項5】

宿主細胞が微生物である請求項1～4記載の化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能の評価方法。

#### 【請求項6】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするラット由来の遺伝子。

#### 【請求項7】

配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子。

#### 【請求項8】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を有し、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、修飾もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 9】

配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子。

【請求項 10】

配列番号2で示される塩基配列を有するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子。

【請求項 11】

請求項 6～10 記載のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の部分塩基配列を有する DNA 断片。

【請求項 12】

請求項 6～10 記載のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を含有するベクター。

【請求項 13】

請求項 6～10 記載の遺伝子を含有するベクターであって、(1) 宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 請求項 6～10 記載のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子、および (3) 宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなる DNA 断片を含有するベクター。

【請求項 14】

請求項 12 または 請求項 13 記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 15】

宿主細胞が微生物である請求項 14 記載の形質転換体。

【請求項 16】

宿主細胞が植物である請求項 14 記載の形質転換体。

【請求項 17】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする

コナミドリムシ由来の遺伝子。

【請求項 18】

配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子。

【請求項 19】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を有し、配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、修飾もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 20】

配列番号 9 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子。

【請求項 21】

配列番号 10 で示される塩基配列を有するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子。

【請求項 22】

請求項 17～21 に記載のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の部分塩基配列を有する DNA 断片。

【請求項 23】

請求項 17～21 記載のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を含有するベクター。

【請求項 24】

請求項 17～21 記載の遺伝子を含有するベクターであって、(1) 宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 請求項 17～21 記載のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子、および (3) 宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなる DNA 断片を含有するベクター。

【請求項 25】

請求項 23 または請求項 24 記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 26】



宿主細胞が微生物である請求項 25 記載の形質転換体。

【請求項 27】

宿主細胞が植物である請求項 25 記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能評価方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

植物、動物、および微生物は 5-アミノレブリン酸を初発とするポルフィリン生合成系を持ち、ヘム生合成等の前駆物質であるプロトポルフィリンを生産する。このポルフィリン生合成系の最後の段階であるプロトポルフィリノーゲンを酸化しプロトポルフィリンを生成する反応を触媒する酵素が、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protoporphyrinogen IX oxidase ; EC 1.3.3.4) (以下、PPO と記す。) である (R. J. Porra, and J. E. Falk, (1964年) Biochem. J. 90巻、69-75頁)。

PPO 活性は、植物、動物、および微生物の生育に影響を及ぼし、例えば、一般に植物 PPO 活性を阻害する化合物が除草活性を有することが知られている。そこで、PPO 阻害型の除草剤を効率よく開発するうえで、化合物の PPO 活性阻害能を簡便に評価する方法が切望されていた。

【0003】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討を行った結果、PPO 活性に基づく増殖能が欠損した宿主細胞に所望の PPO 遺伝子を発現させた形質転換体を用い、化合物による該形質転換体の増殖阻害度を調べることにより、化合物の PPO 活性阻害能を評価することが可能であることを見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

化合物の PPO 活性阻害能を評価する方法であって、

(1) PPO活性に基づく増殖能が欠損した宿主細胞に、宿主細胞内で機能可能なプロモーター、PPO遺伝子、および宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなるDNA断片（以下、発現DNA断片と記す。）が導入されてなり、前記DNA断片に在するPPO遺伝子を発現する形質転換体を、被験化合物の存在下及び非存在下に、プロトヘムまたはその誘導体を含まない培地で培養して各条件下における該形質転換体の増殖度を測定する工程、

(2) 該増殖度の差異に基づき、被験化合物の接触による前記形質転換体の増殖阻害度を求め、化合物のPPO活性阻害能を判定する工程、

を含むことを特徴とする化合物のPPO活性阻害能の評価方法（以下、本発明評価方法と記す。）、

該方法に関するPPO遺伝子、

該遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片、

該遺伝子を含有するベクター、

該ベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体を提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0005】

まず、本発明のPPO活性阻害能評価方法について説明する。

本発明評価方法において使用されるPPO遺伝子は、宿主細胞内で発現した際にPPO活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であればよく、例えば、植物または動物に由来するPPO遺伝子から選ぶことができる。具体的には例えば、シロイヌナズナ、ダイズ、アブラナ、テンサイ、ジャガイモ、タバコなどの双子葉類植物、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、エンバク、ライムギ、サトウキビ、ソルガムなどの単子葉類植物、コナミドリムシ、クロレラなどの藻類植物、マウス、ラット、ヒトなどの哺乳類動物、ニジマス、ブルーギル、コイ、メダカ、グッピー、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノーなどの魚類動物、ハエ、カ、ゴキブリ、テントウムシ、トンボ、カイコガなどの昆虫類動物等に由

来するPPO遺伝子をあげることができる。

本発明評価方法において使用される「宿主細胞内で機能可能なプロモーター」とは、形質転換される宿主細胞内で転写活性を示すDNA断片であって、例えば、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター (lacP)、トリプトファンオペロンのプロモーター (trpP)、アルギニンオペロンのプロモーター (argP)、ガラクトースオペロンのプロモーター (galP)、tacプロモーター、T7プロモーター、T3プロモーター、 $\lambda$ ファージのプロモーター ( $\lambda$ -pL、 $\lambda$ -pR)、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH) プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート (Ad.ML) プロモーター、SV40の初期プロモーター、バキュロウイルスプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子 (OCT) プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の19Sおよび35Sプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ (CHS) 遺伝子プロモーター等をあげることができる。

また、「宿主細胞内で機能可能なターミネーター」としては、形質転換される宿主細胞内で転写終結活性を示すDNA断片であればよい。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのターミネーター、アルギニンオペロンのターミネーター、ガラクトースオペロンのターミネーター、酵母のHIS ターミネーター、ADH1ターミネーター、SV40のearly splicing region、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) ターミネーター、ニンニクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどをあげることができる。

ここで、「機能可能な形で結合されてなるDNA断片」とは、前記PPO遺伝子が、導入される宿主細胞において前記プロモーターおよびターミネーターの制御下に発現するように、これらのプロモーターおよびターミネーターと結合された状態にあるDNA断片を意味する。

#### 【0006】

かかる発現DNA断片を、PPO活性に基づく増殖能の欠損した宿主細胞に導入して、導入したPPO遺伝子を発現する形質転換体を取得する。

形質転換される宿主細胞としては、増殖に必要なPPO活性の欠損した宿主細

胞であればよく、簡便に培養できる点で微生物が好ましい。増殖に必要な P P O 活性の欠損した微生物として、例えば、K.Miyamoto、K.Nakahigashi、K.Nishimura、T.Nakayashiki、H.Inokuchi、(1991年) Journal of Molecular Biology、219巻、393-398頁、及び、K.Nishimura、T.Nakayashiki、H.Inokuchi、(1993年) Gene、133巻、109-113頁等に記載されている P P O 遺伝子 (hemG遺伝子座) 欠損突然変異系統大腸菌 VSR751株、あるいは、F.Yamamoto、H.Inokuchi、H.Ozeki、(1988年) Jpn.J.Genet.、63巻、237-249項等に記載されている P P O 遺伝子 (hemG遺伝子座) 欠損突然変異系統大腸菌 BT3株、J.-M.Camadro、D.Urban-Grima l、 and P. Labbe (1982) Biochem.Biophys.Res.Comm.、106巻、724-730頁等に記載されている P P O 遺伝子 (hem14-1遺伝子座) 突然変異系統酵母 hem14-1株等をあげることができる。

ここで、前記の発現 DNA 断片は、ベクターに組み込んで宿主細胞に導入するとよい。該発現 DNA 断片を含むベクターは公知の手段に準じて宿主細胞に導入することができる。例えば、宿主細胞が微生物の場合、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法 (Methods in Electroporation:Gene Pulser /E.coli Pulser System, Bio-Rad Laboratories, 1993年)等により上記ベクターを微生物細胞内に導入することができる。また、宿主細胞が植物の場合、アグロバクテリウム感染方法 (特公平2-58917及び特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法 (特開昭60-251887及び特開平5-68575)、又はパーティクルガン方法 (特表平5-508316及び特開昭63-258525) 等により上記ベクターを植物細胞に導入することができる。導入した P P O 遺伝子を発現する形質転換体は、上記ベクターを導入した宿主細胞を、該ベクターに座上・連結させた選抜マーカーに対応する増殖阻害剤を含みプロトヘムまたはその誘導体を含まない培地で培養し、該培地において増殖可能なクローンを単離することにより、取得することができる。

#### 【0007】

上記のようにして得られる形質転換体を、種々の濃度の被験化合物の存在下および非存在下にプロトヘムまたはその誘導体を含まない培地中で培養し、各々の条件下における形質転換体の増殖度を測定し、各条件での被験化合物との接触に

よる該形質転換体の増殖度の差異に基づき、被験化合物による前記形質転換体の増殖阻害度を求める。このようにして求められる増殖阻害度を、複数の被験化合物について比較することにより、PPO活性阻害能の高低が判定される。より具体的には、例えば、化合物を添加しない系における上記形質転換体の増殖度を100%として、該形質転換体の増殖度を50%阻害する化合物濃度を求める。該濃度が低い化合物は、それが高い化合物よりもPPO活性阻害能が高いと判定することができる。また、例えば、PPO活性を阻害することが既に知られている化合物（陽性対照）を、被験化合物の1つとして同時に試験に付することにより、各被験化合物の増殖阻害度の指標とすることもできる。尚、ここで、被験化合物による増殖阻害がPPO活性阻害によるものであることは、前記形質転換体の培養を例えばヘミンのようなプロトヘムまたはその誘導体を含む培地で行うことにより容易に確認できる。

#### 【0008】

本発明評価方法において、さらに、前記発現DNA断片のプロモーターに「宿主細胞で機能可能でありかつ転写活性が制御されうるプロモーター」を用い、「該発現DNA断片のプロモーターの転写活性を制御可能な遺伝子、該遺伝子により転写活性を制御されずかつ宿主細胞内で機能可能なプロモーターおよび宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなるDNA断片」（以下、調節DNA断片と記す。）を、前記宿主細胞に導入することにより、形質転換体におけるPPO遺伝子の発現量を変化させることができ、被験化合物のPPO活性阻害能を、より少量の化合物でしかもより精度よく評価することが可能となる。

即ち、形質転換体におけるPPO遺伝子の発現量を少なくなるように調節することにより、低濃度の被験化合物でも精度よくPPO活性阻害能を評価でき、例えば、水溶性の低い被験化合物の評価も可能になると共に、極めて少量の被験化合物の評価も可能となる。

また、PPO活性阻害能が著しく高く、有効希釈倍率に達しても過度に高いPPO活性阻害能を呈する被験化合物の場合には、形質転換体におけるPPO遺伝子の発現量を増加させるように調節することにより、該被験化合物のPPO活性

阻害能を精度よく評価することも可能となる。

ここで、「発現DNA断片のプロモーター活性を制御可能な遺伝子」とは、発現DNA断片の「転写活性が制御されうるプロモーター」の転写活性を抑制または亢進する機能を持つ遺伝子を意味する。PPO遺伝子の発現量を少なくする場合は、上記発現DNA断片のプロモーターの転写活性を抑制する遺伝子を用い、PPO遺伝子の発現量を増やす場合は、該プロモーターの転写活性を亢進する遺伝子を用いればよい。具体的には、転写活性を抑制する組み合わせとしては、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーターとlacI、アルギニンオペロンのプロモーターとargR、ガラクトースオペロンのプロモーターとGalRの組み合わせ等が、逆に転写活性を亢進する組み合わせとしては、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーターとcrp、肺炎桿菌のマルトースレギュロンとmalTの組み合わせ等があげられる。

また、上記調節DNA断片のプロモーターは、自身が制御する遺伝子に影響されないプロモーターであればよい。例えば、前記のラクトースオペロンのリプレッサー遺伝子に組み合わせるプロモーターには自身のプロモーターやノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター等を利用することができる。

上記発現DNA断片および調節DNA断片は、同一または異なるベクターに組み込んで宿主細胞に導入することができ、これらのDNA断片は、宿主細胞の染色体に組み込まれていてもよい。

#### 【0009】

本発明評価方法は、PPO活性阻害能に基づく化合物の生理活性の評価に利用することができ、例えば、光要求型除草剤の効力評価、または除草活性を有する化合物のスクリーニング等に利用できる他、悪性細胞の増殖阻害能を有する医薬品等のスクリーニングにも利用し得る。

本発明評価方法を光要求型除草剤の効力評価または除草活性を有する化合物のスクリーニング手段として利用する場合は、例えば、シロイヌナズナ等の高等植物由来のPPO遺伝子、コナミドリムシ等の藻類由来のPPO遺伝子等を用いて、本発明のPPO活性阻害能評価方法を実施する。その結果、高等植物や藻類等由来のPPO遺伝子を導入した形質転換体の生育を阻害する化合物は、除草剤有

効成分として有用である可能性が示される。

#### 【0010】

次に、本発明のPPO活性阻害能評価方法に使用され得る遺伝子についてより詳細に説明する。

例えば、「PPO活性を有するタンパク質をコードするラット由来の遺伝子」（以下、本発明ラットPPO遺伝子と記す。）は、ラットから得られる約1.64 kbpの長さを有する遺伝子であり、具体的には例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするPPO遺伝子、PPO活性を有し、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、修飾もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子があげられる。より具体的には例えば、配列番号2で示される塩基配列を有するPPO遺伝子等を挙げることができる。

また、例えば、「PPO活性を有するタンパク質をコードするコナミドリムシ由来の遺伝子」（以下、本発明コナミドリムシPPO遺伝子と記す。）は、コナミドリムシから得られる約2kbpの長さを有する遺伝子であり、具体的には例えば、配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするPPO遺伝子、PPO活性を有し、配列番号9で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、修飾もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子があげられる。より具体的には例えば、配列番号10で示される塩基配列を有するPPO遺伝子等を挙げることができる。

#### 【0011】

本発明ラットPPO遺伝子は、ラットから例えば下記の方法により得られる。

例えば、ラットの肝臓、腎臓等の組織を採取し、採取した組織から、例えば、増補版ラボマニュアル遺伝子工学（村松編、丸善株式会社1990年）76-77頁等に記載されている方法に準じて操作を行うことにより、RNAを抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キット、具体的には例えば、ISOGEN（日本ジーン社）等を利用して良い。

得られたRNAから、例えば、市販のpoly(A)RNA分画キット、具体的には例えば、BIOMAG mRNA Purification kit（パーセプティブバイオシステム社）等を用

い付属のマニュアルに準じて操作を行いpoly(A)RNAを調製する。得られたpoly(A)RNAから、例えば、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編、農村文化社1989年）74-103頁等に記載されている方法に準じて操作を行いcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリー作製操作には、市販のcDNAライブラリー作製キット、具体的には例えば、ZAP-cDNA Gigapack Cloning Kit（STRATAGENE社）等を利用しても良い。

このようにして作製したcDNAライブラリー、または、市販のcDNAライブラリー、具体的には例えば、STRATAGENE社のラット肝臓由来のcDNAライブラリー等から、Molecular Cloning 2nd edition（J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年）2.60-2.81頁等に記載されている方法によりDNAを調製することができる。

このように調製されたDNAを鋳型に、例えば、配列番号3および4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼチェーン反応を行うことにより、PPO遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片を増幅することができる。この増幅されたPPO遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片を、増補版ラボマニュアル遺伝子工学（村松編、丸善株式会社1990年）117-120頁等に記載される通常の方法、または市販のDNAクローニングキット、例えば、TA cloning kit（Invitrogen社製）等を用いることによりプラスミドにクローニングし、塩基配列の決定に供することができる。塩基配列の決定は、例えば、Molecular Cloning 2nd edition（J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年）13.42-13.74等に記載されるダイデオキシ法によって行うことができる。ダイデオキシ法による塩基配列の決定には、例えば、蛍光ラベルされたダイデオキシヌクレオチドを用いるシーケンスキット、具体的には例えば、Dye terminator cycle sequencing kit（PEアプライドバイオシステムズ社製）等を利用し、市販のオートシーケンサー、例えば、DNAシーケンサー373S（PEアプライドバイオシステムズ社製）等を用いることができる。

この様にしてラットPPO遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片（以下、本発明ラットPPO DNA断片と記す。）を得ることができる。本発明ラットP



PODNA断片としては、例えば、配列番号2の塩基番号639～1333に示される塩基配列を有する遺伝子断片をあげることができる。本発明ラットPPODNA断片は、例えば、後述するポリメラーゼチェーン反応法において使用されるPPO遺伝子特異的なプライマーを作製する際に利用したり、また、後述するハイブリダイゼーション法においてPPO遺伝子検出用プローブとして使用することができる。

### 【0012】

本発明ラットPPODNA断片を基に、以下に示す(1)ポリメラーゼチェーン反応法、または(2)ハイブリダイゼーション法によりPPOをコードする全塩基配列を有する本発明ラットPPO遺伝子を取得することができる。

ポリメラーゼチェーン反応法を利用して、本発明ラットPPO遺伝子を取得するには、まず、本発明ラットPPODNA断片の塩基配列中の約15bpから約40bpの塩基配列を有するプライマー（3'下流領域増幅用プライマー）、および、本発明ラットPPODNA断片の塩基配列に相補的な塩基配列の中の約15bpから約40bpの塩基配列を有するプライマー（5'上流領域増幅用プライマー）を作製する。具体的に例えば、3'下流領域増幅用プライマーとしては配列番号2の塩基番号1175～1198に示される塩基配列を有する遺伝子断片等が、5'上流領域増幅用プライマーとしては配列番号2の塩基番号776～799に示される塩基配列に相補的な塩基配列を有する遺伝子断片等が挙げられる。

次いで、ラット由来のDNAの末端にアダプターDNAが付加されてなるDNA断片またはラット由来のDNA断片の挿入されたベクターのDNAを鋳型とし、かつ、アダプターDNAの部分塩基配列を有するプライマーもしくはベクターDNAの部分塩基配列を有するプライマーと5'上流領域増幅用プライマーとの組み合わせ及びアダプターDNAの部分塩基配列を有するプライマーもしくはベクターDNAの部分塩基配列を有するプライマーと3'下流領域増幅用プライマーとの組み合わせを用いてポリメラーゼチェーン反応を行い、本発明ラットPPODNA断片の5'上流側の塩基配列を含むDNA断片及び本発明ラットPPODNA断片の3'下流側の塩基配列を含むDNA断片をポリメラーゼチェーン反応で増幅する。ここで鋳型として用いられるラット由来のDNAの末端にアダプターDNAが付加されてなるDNA断片は、例えば

、上述のように調製されたラット由来のcDNAにターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼでシトシン等の塩基のポリマーをアダプターDNAとして付加するか、または、市販のRACE (rapid amplification of cDNA ends) 反応用キットのアダプター、具体的には例えば、Clontech社のMarathon cDNA amplification kitに付属のアダプター等をラット由来のcDNAに付加することにより調製することができる。また、アダプターDNAの部分塩基配列を有するプライマーとしては、例えば、市販のRACE (rapid amplification of cDNA ends) 反応用キットに付属のアダプターに特異的なプライマー、具体的には例えば、Clontech社のMarathon cDNA amplification kitに付属のAP-1プライマーやAP-2プライマーをあげることができる。ベクターDNAの部分配列を有するプライマーとしては、例えばベクターがλファージに由来するベクターである場合、λファージのアーム領域に特異的なプライマー、具体的には例えば、λgt11リバースプライマーやλgt11フォワードプライマー等を用いることができる。

このようにして増幅された2種のDNA断片は、増補版ラボマニュアル遺伝子工学(村松編、丸善株式会社1990年)117-120頁等に記載される通常の方法、あるいは市販のDNAクローニングキット、例えば、TA cloning kit (Invitrogen社製)等を用いることによりプラスミドにクローニングし、塩基配列の決定に供することができる。塩基配列の決定は、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年)13.42-13.74等に記載されるダイデオキシ法によって行うことができる。ダイデオキシ法による塩基配列の決定には、例えば、蛍光ラベルされたダイデオキシヌクレオチドを用いるシーケンスキット、具体的には例えば、Dye terminator cycle sequencing kit (PEアプライドバイオシステムズ社製)等を利用し、市販のオートシーケンサー、例えば、DNAシーケンサー373S (PEアプライドバイオシステムズ社製)等を用いることができる。ここで決定された塩基配列と上述のプライマー作成の際に参照した本発明ラットPPO DNA断片の塩基配列において重複する領域を重ねあわせてこれらの塩基配列を連結することにより一つの塩基配列を作成する。作成された塩基配列について遺伝子解析ソフト、例えば、GENETYX (SDC社製)等を用いてオープンリーディングフレームの検索を行

うことにより、該塩基配列にPPOをコードするオープンリーディングフレームの全領域が含まれているか検討することができる。決定された塩基配列に1.6kbp以上のオープンリーディングフレームの全体が含まれず、翻訳開始コドンまたは翻訳停止コドンが含まれない場合は、該塩基配列に完全長PPO遺伝子の全塩基配列が含まれていないと判断し、PPOをコードする全塩基配列を有するPPO遺伝子が得られるまで上記のポリメラーゼチェーン反応法による遺伝子断片の取得工程を繰り返し行う。また、上記のように決定された塩基配列に見出されるオープンリーディングフレームが、決定された塩基配列の5'上流側または3'下流側のいずれかにおいてのみ欠けている場合、すなわち、オープンリーディングフレームに翻訳開始コドンまたは翻訳停止コドンのいずれかが含まれない場合は、その欠けている側の塩基配列を含むDNA断片の取得について上述と同様にポリメラーゼチェーン反応法による遺伝子断片の取得を繰り返せばよい。

このようにして決定された塩基配列の情報をもとに、PPO遺伝子の塩基配列の翻訳開始コドン付近の塩基配列を含むプライマー（N末端プライマー）及び翻訳停止コドン付近の塩基配列に相補的な塩基配列を含むプライマー（C末端プライマー）を作製し、ラット由来のDNAを鋳型としかつ前記両末端プライマーを用いてポリメラーゼチェーン反応を行うことにより、PPOをコードする全塩基配列を有する本発明ラットPPO遺伝子を増幅しこれをクローニングすることができる。N末端プライマーとしては、例えば、配列番号5で示される塩基配列を有するプライマー、配列番号7で示される塩基配列を有するプライマーなどをあげることができ、C末端プライマーとしては、例えば、配列番号6で示される塩基配列を有するプライマー、配列番号8で示される塩基配列を有するプライマーなどをあげることができる。また、上述の遺伝子断片の取得工程で得られたDNA断片を、重複している領域に存在する制限酵素認識部位で結合することによっても、PPOをコードする全塩基配列を有する本発明ラットPPO遺伝子を取得することができる。

#### 【0013】

(2) ハイブリダイゼーション法を利用して本発明ラットPPO遺伝子を取得するには、ラット由来のDNAに対して、前述の本発明ラットPPO DNA断片をプ

プローブとしてハイブリダイズさせることにより、PPO遺伝子をコードするDNA断片を特定し、特定されたDNA断片を単離すればよい。

ここでハイブリダイゼーション法に用いるプローブは上記のようにして得られた本発明ラットPPO DNA断片を、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 10.6-10.26頁等に記載される通常の方法で、標識化合物を用いて標識することにより調製できる。標識化合物は、例えば、放射性同位元素（以下、RIと記す。）を含む化合物や蛍光試薬等の標識化合物を用いることができる。RIを含む化合物を用いた標識は、例えば、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP（アマシャム社製）及びランダムプライムラベリングキット（ベーリンガー・マンハイム社製）等を用いてキットに付属のプロトコールに準じて行うことができる。また、非RI標識は、例えば、DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I（ベーリンガー・マンハイム社製）等とこれに付属の試薬を用い付属のプロトコールに準じて行うことができる。

プローブをハイブリダイズさせるラット由来のDNAとしては、例えば、ラット由来のcDNAを適当なリンカーでλファージ由来のベクター等に連結し、該cDNAをファージ粒子内にパッケージングすることにより得られるラットcDNAライブラリー等を用いることができる。このような遺伝子ライブラリーは、例えば、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編、農村文化社1989年）74-103頁等に記載される方法に準じて調製することができる。また、Clontech社、STRATAGENE社等から市販されているラット遺伝子ライブラリーを用いることもできる。

本発明の遺伝子を単離するには、例えば、上述の方法により作製されたプローブを用いて上記のラット遺伝子ライブラリーに対して、コロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション法等を行うとよい。これらは、例えば、組換えDNA実験（J.R.Dillon, A.Nasim, E.R.Nestmann編、東京科学同人 1987年）98-101頁等に記載される方法、あるいは、Molecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 1.90-1.104頁または2.108-2.117頁等に記載される通常の方法で

行うことができる。得られたクローンに組み込まれているDNA断片の塩基配列決定は、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Frisch, T. Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 13.42-13.74頁等に記載されるダイデオキシ法によって行うことができる。ダイデオキシ法による塩基配列の決定には、例えば、蛍光ラベルされたダイデオキシヌクレオチドを用いるシーケンスキット、具体的には例えば、Dye terminator cycle sequencing kit (PEアプライドバイオシステムズ社製) 等を利用し、市販のオートシーケンサー、例えば、DNAシーケンサー373S (PEアプライドバイオシステムズ社製) 等を用いることができる。決定された塩基配列を市販の遺伝子解析ソフト、例えば、GENETYX (SDC社) を用いて解析することにより、本発明ラットPPO遺伝子の全塩基配列を明らかにする。

【0014】

また、本発明コナミドリムシPPO遺伝子は、コナミドリムシから例えば下記の方法により得られる。基本的な操作は、本発明ラットPPO遺伝子取得に関する上記の記載に準じて行なうことが可能である。

まず、コナミドリムシを培養して細胞を集め、集めた細胞から、RNAを抽出する。得られたRNAから、前記の本発明ラットPPO遺伝子の取得方法に準じてcDNAライブラリーを作製し、そのDNAを調製する。

このように調製されたDNAを鋳型に、例えば、配列番号11および12で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼチェーン反応を行うことにより、コナミドリムシPPO遺伝子の塩基配列を有するDNA断片を増幅することができる。増幅されたPPO遺伝子の塩基配列を有するDNA断片を、プラスミドにクローニングし、塩基配列の決定に供することができる。

# 【0015】

このようにして得られた本発明ラットPPO遺伝子のcDNAもしくは本発明ラットPPO DNA断片、または本発明コナミドリムシPPO遺伝子のcDNAを用いて下記の方法により本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子のゲノムDNAクローンを取得しその塩基配列を決定することができる。まず、本発明ラットPPO遺伝子のゲノムDNAクローンの場合、例えば、ラットの肝臓、腎臓等の組織を採取し、採取した組織から、例えば、増補版ラボマニュアル遺伝子工学（村松編、丸善株式会社1990年）76-77頁等に記載される方法に準じて操作を行うことによりゲノムDNAを抽出する。また、本発明コナミドリムシPPO遺伝子のゲノムDNAクローンの場合、例えば、コナミドリムシを培養して細胞を集め、集めた細胞から同様の操作によりゲノムDNAを抽出する。該抽出操作には、市販のゲノムDNA抽出キット、具体的には例えば、ISOTISSUE（日本ジーン社）等を用いることができ、キットに付属のプロトコールに準じて操作を行うことでゲノムDNAを得ることができる。該ゲノムDNAを適当な制限酵素で切断した後、得られたゲノムDNA断片を、例えば、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編、農村文化社1989年）276-279頁等に記載されるNaCl密度勾配遠心法に準じて分画する。分画された各ゲノムDNA断片画分のうちベクターに組み込むのに適している大きさのゲノムDNA断片を含む画分、具体的には、ファージベクターを用いる場合は9kbp～23kbpのゲノムDNA断片を含む画分、コスミドベクターを用いる場合は30kbp～42kbpのゲノムDNA断片を含む画分を選択すると一般的によい。得られたゲノムDNA断片を用い、例えば、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編、農村文化社1989年）96-103頁および280-284頁等に記載される方法に準じて、または、市販のゲノムDNAライブラリー作製キット、具体的には例え

ば、Lambda EMBL3/Gigapack cloning kit (STRATAGENE社) を用いて付属のプロトコールに準じて操作を行い、ゲノムDNAライブラリーを作製する。作製したゲノムDNAライブラリー、または市販のゲノムDNAライブラリー、具体的には例えば、STRATAGENE社のラットゲノムDNAライブラリー等に対して、本発明ラット P P O 遺伝子の cDNA もしくは本発明ラット P P O DNA 断片、または、本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子の cDNA をプローブとして、例えば、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編、農村文化社1989年）106-147頁等に記載される方法に準じてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことにより、本発明ラット P P O 遺伝子、または、本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子の塩基配列を含むゲノムDNAクローンを取得することができる。得られたゲノムDNAクローンは、例えば、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編、農村文化社1989年）152-174頁に記載される方法に準じて、塩基配列の解析に適切なベクター、例えば、プラスミド等にサブクローニングした後、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook、 E.F.Frisch、 T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 13.15等に記載されるプライマーエクステンション法に準じて、ダイデオキシ法等により塩基配列の決定を行うことができる。ダイデオキシ法による塩基配列の決定は、市販されているキット、具体的には例えば、PEアプライドバイオシステムズ社製のDye terminator cycle sequencing kitを用い、DNAシーケンサー、例えば、PEアプライドバイオシステムズ社のModel 373 Sを用いて行うことができる。

# 【0016】

さらに、Bina-Stem Met et al., (1979年) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 76巻、731頁やSollner-Webb and R.H.Reeder, (1979年) Cell, 18巻、485頁などに記載されるプライマーエクステンション法またはA.J.Berk and P.A.Sharp, (1978年) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 75巻、1274頁等に記載されるS1マッピング法等により、本発明ラット P P O 遺伝子、または、本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子のゲノムDNAのそれぞれの転写開始点を決定することができる。通常この転写開始点の上流約1kbから約10kbに遺伝子発現の制御を担うプロモーター

配列がある。

【0017】

また、本発明ラット P P O 遺伝子および本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子は、光要求型除草剤として知られる P P O 活性阻害剤に対する耐性遺伝子を得るか、または作り出すための手段にも利用できる。例えば、本発明ラット P P O 遺伝子または本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子にコードされる P P O のアミノ酸配列に変更を加える変異を P P O 遺伝子に導入し、光要求型除草剤耐性を示す P P O のアミノ酸配列をコードする遺伝子をスクリーニングすることによって新たな除草剤耐性遺伝子を作り出すことが可能になる。具体的には、例えば、A. Greene, M. Callahan, *Strategies*, 1994年、7巻、32-34頁等に記載される方法により本発明ラット P P O 遺伝子または本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子の塩基配列にランダムな突然変異を誘導してアミノ酸配列に変異を導入する方法によって新たな光要求型除草剤耐性遺伝子を作り出すことが可能となる。また、W. Kramer, et al., *Nucleic Acids Research*, 1984年、12巻、9441頁もしくは W. Kramer, H. J. Frits, *Methods in Enzymology*, 1987年、154巻、350頁等に記載のギャップド・デュープレックス (gapped duplex) 法、または、T. A. Kunkel, *Proc. of Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985年、82巻、488頁もしくは T. A. Kunkel, et al., *Methods in Enzymology*, 1987年、154巻、367頁等に記載のクンケル (Kunkel) 法等に準じて、本発明ラット P P O 遺伝子または本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子の塩基配列に部位特異的に変異を導入してアミノ酸配列を改変する方法によっても新たな光要求型除草剤耐性遺伝子を作り出すことが可能になる。さらに、本発明ラット P P O 遺伝子または本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子がコードする P P O のアミノ酸配列のうち一ヶ所ないし数ヶ所の部分アミノ酸配列を、本発明コナミドリムシ P P O 遺伝子、本発明ラット P P O 遺伝子、または他の生物由来の P P O のアミノ酸配列の一部と入れ換えたキメラ酵素タンパク質をコードする遺伝子を作製することによっても新たな光要求型除草剤耐性遺伝子を作り出すことが可能になる。このようにして作製された光要求型除草剤耐性遺伝子の効果 (除草剤耐性発現) は、例えば、作製された除草剤耐性遺伝子を P P O 欠損の微生物または対象とする除草剤に対して感受性の P P O を持つ微生物に導入し、形質転換



微生物を選抜した後、該形質転換微生物を、対象とする除草剤で処理し除草剤耐性コロニーを再選抜する方法で効率的に確認することができる。

【0018】

本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子を含むベクターとしては、具体的には、例えば、配列番号1または配列番号9で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するPPO遺伝子をpCR2.1 (Invitrogen社) にクローニングし作成したプラスミドがあげられ、該プラスミドはベクター部分が小さく、大腸菌でコピー数が多いという特徴を有しており、DNA調製やDNA構造解析を行うのに適している。

【0019】

本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子を宿主細胞内で発現させることのできるベクターは、例えば、(1) 宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子、及び(3) 宿主細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させたDNA断片をベクターに挿入することにより構築することができる。ここで、「機能可能な形で」とは、該ベクターを宿主細胞に導入し宿主細胞を形質転換させた際に、該ベクターに在する本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子が、プロモーターおよびターミネーターの制御下に発現するように、これらのプロモーターおよびターミネーターと結合された状態にあることを意味する。

「宿主細胞で機能可能なプロモーター」としては、形質転換される宿主生物内で転写活性を示すものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH) プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート (Ad.ML) プロモーター、SV40の初期プロモーター、バキュロウイルスプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子 (OCT) プロモーター、カリフラワーマザイクウイルス (CaMV) 由来の19Sおよび35Sプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ (CHS) 遺伝子プロモーター等をあげることがでる。

また、「宿主細胞内で機能可能なターミネーター」としては、形質転換される宿主生物内で転写終結活性を示すものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのターミネーター、酵母のHISターミネーター、ADH1ターミネーター、SV40のearly splicing region、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーター、ニンニクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどをあげることができる。

#### 【0020】

上記のようなベクターを宿主細胞に導入することにより該宿主細胞を形質転換できる。例えば、宿主細胞が微生物の場合、上記ベクターを塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法 (Methods in Electroporation: Gene Pulser /E.coli Pulser System, Bio-Rad Laboratories, 1993年)等の公知の手段によって微生物細胞内に導入することができる。また、宿主細胞が植物の場合、上記のような本発明のベクターをアグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917及び特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887及び特開平5-68575)、又はパーティクルガン方法(特表平5-508316及び特開昭63-258525)などの公知の手段により植物細胞に導入し、本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子が導入された細胞を選抜することによって形質転換植物細胞を得ることができる。得られた形質転換植物細胞から、例えば、植物遺伝子操作マニュアル：トランスジェニック植物の作り方(内宮著、講談社サイエンティフィック1990年)、27-55頁などに記載の植物細胞培養方法により形質転換植物を再生することによって形質転換された植物体を得ることができる。

#### 【0021】

さらに本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子を用いて、(1) 宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 本発明ラットPPO遺伝子または本発明コナミドリムシPPO遺伝子、及び(3) 宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなるDNA断片を含有するベクターを宿主細胞に導入し該宿主細胞を形質転換させることにより、前記宿主細胞のPPO活性またはPPO活性阻害剤に対する感受性を改変することもでき

る。

ここで、「宿主細胞で機能可能なプロモーター」としては、形質転換される宿主生物内で転写活性を示すものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH) プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート (Ad.ML) プロモーター、SV40の初期プロモーター、バキュロウイルスプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子 (OCT) プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の19Sおよび35Sプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ (CHS) 遺伝子プロモーター等をあげることができる。

また、「宿主細胞内で機能可能なターミネーター」としては、形質転換される宿主生物内で転写終結活性を示すものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのターミネーター、酵母のHIS ターミネーター、ADH1ターミネーター、SV40のearly splicing region、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) ターミネーター、ニンニクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどをあげることができる。

上記のような宿主細胞の改変方法により、例えば、PPOをターゲットとする光要求型除草剤に対する耐性を植物に付与することができる。

#### 【0022】

本発明のPPO活性阻害能評価方法に使用される他のPPO遺伝子は、上述の本発明ラットPPO遺伝子の取得方法に準じて取得し、利用することができる。例えば、ウサギ由来のPPO遺伝子を取得するには、市販のウサギcDNAライブラリー、配列番号3および配列番号4で示されるプライマー等を用いるとよい。

#### 【0023】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0024】

実施例1 (ラットPPO DNA断片のクローニング)

配列番号3および4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを調製した。オリゴヌクレオチドはDNA合成装置（PEアプライドシステムズ社：Model 394 DNA/RNA Synthesizer）を用い、合成用溶媒としてModel 394 DNA/RNA Synthesizer用溶媒（PEアプライドシステムズ社）を用い、DNA合成試薬としてアデニン、シトシン、グアニンおよびチミンに相当するフォスフォアミダイト試薬（PEアプライドシステムズ社）を用いて合成した。合成したオリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド精製用カートリッジ（PEアプライドシステムズ社：OPC カートリッジ）で精製したのち減圧乾燥しオリゴヌクレオチドを調製した。

ラット肝臓由来のcDNAの挿入された $\lambda$  ZAPIIベクターからなるライブラリー（STRATAGENE社製）（以下、ラットcDNAライブラリーと記す。）をMolecular Cloning 2nd edition（J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年）2.60から2.65に記載の方法にしたがって、NZCYM寒天培地、数プレートに広げて増幅し、寒天培地からSMバッファーで各々のプレート毎にファージ粒子を溶出した（以下、増幅ライブラリーと記す。）。増幅ライブラリーから、DNA抽出キット（Lambda-TRAP PLUS：Clontech社製）を用いてDNAを抽出しファージクロンDNAを調製した。このファージクロンDNAを鋳型としてポリメラーゼチェーン反応を行い、DNA断片を増幅した。ポリメラーゼチェーン反応における反応液は、10pmolの配列番号3で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、10pmolの配列番号4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、5 $\mu$ lの10 $\times$  PCR Buffer（宝酒造社製）、0.25 $\mu$ lのTaKaRa Taq（宝酒造社製）、各々10 nmolの4種類の塩基（dATP、dCTP、dGTP、dTTP：宝酒造社製）、及び、10ngのファージクロンDNAを0.5ml容ポリメラーゼチェーン反应用チューブに採り、滅菌蒸留水を加えて全量を50 $\mu$ lとして調製した。ポリメラーゼチェーン反応における各工程は下記の条件で行った。変性工程は95 $^{\circ}$ Cで1分間保温し、アニーリング工程は55 $^{\circ}$ Cで2分間保温し、DNAポリメラーゼによる伸長工程は72 $^{\circ}$ Cで3分間保温する第1サイクルを1回行った後、変性工程は95 $^{\circ}$ Cで1分間保温し、アニーリング工程は55 $^{\circ}$ Cで1.5分間保温し、ポリメラーゼによる伸長工程は72 $^{\circ}$ Cで2分間保温する第2サイクルを34回行った。ポリメラーゼチェーン反応終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動で分析し、約700bpの増幅DNA断片が検出される増

幅ライブラリーを選択した。

次いで、選択された増幅ライブラリーを大腸菌に感染させ、上記ラットcDNAライブラリーに添付のマニュアルに記載の方法に従い、ラットcDNAを含むpBluescriptベクターを調製し、これを大腸菌に形質転換し、大腸菌ライブラリーを作製した。次いで、この大腸菌ライブラリーを用いて、組換えDNA実験(J.R.Dillon, A.Nasim, E.R.Nestmann編、東京科学同人 1987年) 98-100頁等に記載されている方法に従いハイブリダイゼーション用のメンブランを作製した。さらに、このメンブランを用いて、DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (ベーリンガー・マンハイム社製) 等とこれに付属の試薬を用い付属のプロトコールに準じてハイブリダイゼーションを行った。プローブとして、配列番号2の塩基番号639~1333に示される塩基配列を有するDNA断片を使用した。その結果、プローブと強くハイブリダイズするクローンを2個得た。

得られたクローンが有するDNA断片の塩基配列をDye terminator cycle sequencing kit (PEアプライドバイオシステムズ社製) およびDNAシーケンサー373S (PEアプライドバイオシステムズ社製) を用い決定した。その結果、配列番号2の塩基番号270~1636に示される塩基配列が明らかとなり、得られた2クローンは同一の塩基配列を有するDNA断片を保持していることが判明した。また、決定された塩基配列には翻訳開始コドンが欠落していることから、クローニングされたDNA断片にコードされるPPO遺伝子は翻訳開始コドン付近を含む5'上流領域が欠けていることが判明した。

#### 【0025】

#### 実施例2 (完全長PPO遺伝子のクローニング)

実施例1で得られたPPO DNA断片において欠けているPPO遺伝子の5'上流領域をクローニングするため、ラットcDNAライブラリーから抽出したDNAを鋳型としてポリメラーゼチェーン反応を行い、DNA断片を増幅した。ポリメラーゼチェーン反応における反応液は、10pmolの配列番号4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、10pmolのT3プライマー(宝酒造社製)、0.5  $\mu$ lのTaKaRa LATAq (宝酒造社製)、5.0  $\mu$ lの10x LA PCR buffer (宝酒造社製)、各々20 nmolの4種類の塩基(dATP、dCTP、dGTP、dTTP: Clontech社製)、及び、10ngのファ

ージクロンDNAを0.5ml容ポリメラーゼチェーン反応用チューブに採り、滅菌蒸留水を加えて全量を50 $\mu$ lとして調製した。ポリメラーゼチェーン反応における各工程は下記の条件で行った。変性工程は95℃で1分間保温し、アニーリング工程は55℃で2分間保温し、DNAポリメラーゼによる伸長工程は72℃で3分間保温する第1サイクルを1回行った後、変性工程は95℃で1分間保温し、アニーリング工程は55℃で1.5分間保温し、ポリメラーゼによる伸長工程は72℃で2分間保温する第2サイクルを34回行った。ポリメラーゼチェーン反応終了後、反応液をMicroSpin S-400HR（ファルマシアバイオテク社製）で濾過することによりポリメラーゼチェーン反応によって増幅されたDNA断片を精製した。

次に、1.5ml容マイクロチューブに、上記のポリメラーゼチェーン反応で増幅されたDNA断片の精製溶液2 $\mu$ l、直鎖化pCR2.1（Invitrogen社製）50ng、1 $\mu$ lの10x Ligation buffer（Invitrogen社製）、4Weiss unitのT4 DNA Ligase（Invitrogen社製）を採り、滅菌蒸留水を加えて全量を10 $\mu$ lとして混合した後、14℃で16時間保温することによりDNA連結反応を行い、ポリメラーゼチェーン反応で増幅されたDNA断片をpCR2.1に連結した。連結反応終了後、該反応液1 $\mu$ lで大腸菌INV $\alpha$ F'株のコンピテントセル（Invitrogen社製）を形質転換し、アンピシリン耐性となった株を選抜した。さらに、選抜された株からプラスミドDNAを抽出しこれらを制限酵素で切断した後アガロースゲル電気泳動で分析することにより、ポリメラーゼチェーン反応で増幅された約1.4 kbpのDNA断片がクローニングされているプラスミドを選抜した。

選抜されたプラスミドが有するDNA断片の塩基配列をDye terminator cycle sequencing kit（PEアプライドバイオシステムズ社製）およびDNAシーケンサー373S（PEアプライドバイオシステムズ社製）を用い決定した。決定された塩基配列を解析したところ、クローニングされた約1.4 kbpのDNA断片は、実施例1で得られたDNA断片と約1.1 kbp重複し、かつ翻訳開始点より上流約150 bpを含んでいることが判った。

約1.4 kbpのDNA断片を有する上記のプラスミドを制限酵素EcoRIおよびHincII（いずれも宝酒造社製）で切断し、約550 bpの断片を回収した。一方、実施例1で得られたクローンの保持するプラスミドを制限酵素EcoRIおよびHincII（いずれも宝

酒造社製)で切断し、5'末端を仔牛小腸アルカリホスファターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。

前述の2つのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて結合した。得られた反応液で大腸菌HB101のコンピテントセル(宝酒造社製)を形質転換しアンピシリン耐性となった株を選抜した。選抜した株に保持されていたプラスミドを制限酵素EcoRIおよびXhoI(いずれも宝酒造社製)で切断した後アガロースゲル電気泳動で分析することにより、約1.7 kbpのDNA断片がクローニングされているプラスミドを選抜した。

得られたクローンが有するDNA断片の塩基配列をDye terminator cycle sequencing kit (PEアプライドバイオシステムズ社製) およびDNAシーケンサー373S (PEアプライドバイオシステムズ社製)を用い決定した。その結果、配列番号2に示した塩基配列が明らかとなり、クローニングされたDNA断片はラット由来PPOをコードする構造遺伝子全長(1431 bp)を含むことが判明した。

#### 【0026】

##### 実施例3 (PPOアミノ酸配列の解析)

実施例2で決定されたラット由来のPPO遺伝子cDNAの塩基配列を、遺伝子解析ソフト(GENETYX:SDC社製)を用いてアミノ酸配列に翻訳する解析を行った。その結果、クローニングされたラット由来のPPO遺伝子cDNAがコードするタンパク質は477個のアミノ酸残基より構成され、そのアミノ酸配列は配列番号1に示したアミノ酸配列であった。

#### 【0027】

##### 実施例4 (ラットPPO遺伝子のラット大腸菌発現用ベクターの構築)

配列番号5および6で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを調製した。オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドシステムズ社:Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用い、合成用溶媒としてModel 394 DNA/RNA Synthesizer用溶媒(PEアプライドシステムズ社)を用い、DNA合成試薬としてアデニン、シトシン、グアニンおよびチミンに相当するフォスフォアミダイト試薬(PEアプライドシステムズ社)を用いて合成した。合成したオリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプライドシステムズ社:OPC カートリ

ッジ)で精製したのち減圧乾燥しオリゴヌクレオチドを調製した。

実施例2で得られたラット由来のPPOをコードする全長遺伝子cDNAを鋳型とし、かつ、配列番号5及び配列番号6で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼチェーン反応を行い、PPOをコードする約1.5kbpのDNA断片を増幅した。ポリメラーゼチェーン反応における反応液は10pmolの配列番号5で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、10pmolの配列番号6で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、0.5 $\mu$ lのTaKaRa LATaq (宝酒造社製)、5.0 $\mu$ lの10x LA PCR buffer (宝酒造社製)、各々20nmolの4種類の塩基 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP: Clontech社製)、及び、10ngの実施例2により得られたラットPPOの全長cDNAを含むプラスミドを0.5ml容ポリメラーゼチェーン反应用チューブに採り、滅菌蒸留水を加えて全量を50 $\mu$ lとして調製した。ポリメラーゼチェーン反応における各工程は下記の条件で行った。変性工程は95℃で1分間保温し、アニーリング工程は55℃で2分間保温し、DNAポリメラーゼによる伸長工程は72℃で3分間保温する第1サイクルを1回行った後、変性工程は95℃で1分間保温し、アニーリング工程は55℃で1.5分間保温し、ポリメラーゼによる伸長工程は72℃で2分間保温する第2サイクルを34回行った。

ポリメラーゼチェーン反応終了後、反応液をMicroSpin S-400HR (ファルマシアバイオテク社製)で濾過することによりポリメラーゼチェーン反応によって増幅されたDNA断片を精製した。このDNA断片の末端を制限酵素SacIIおよび、SmaIで切断した。一方、pBluescriptII SK+ (Stratagene社製)を制限酵素SacIIおよび、SmaI (いずれも宝酒造社製)で切断し、5'末端を仔牛小腸アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製)で脱リン酸化した。

前述の2つのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット (宝酒造社製)を用いて結合した。得られた反応液で大腸菌 JM109 のコンピテンセル (宝酒造社製)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、ラットPPO遺伝子の大腸菌発現用ベクターを取得した。

【0028】

実施例5 (ラットPPO遺伝子による大腸菌hemG欠損株の相補性試験)



実施例4で得た発現ベクターをF.Yamamoto、H.Inokuchi、H.Ozeki、(1988年) Japanese Journal of Genetics、63巻、237-249項等に記載されているPPO遺伝子(hemG遺伝子座)欠損突然変異系統大腸菌BT3株に導入し、カナマイシンを終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、アンピシリンを終濃度 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう含むLB寒天培地に塗抹接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ で2日間培養を行った。BT3株はLBプレート上で増殖不良となり小さなコロニーしか形成しなかったのに対し、ラットPPO遺伝子発現ベクターを導入した株では比較的大きなコロニーが形成された。

【0029】

実施例6(ラットPPO活性に対する化合物の阻害能試験)

実施例5で得られたラットPPO遺伝子発現ベクターが導入された大腸菌BT3株の終夜培養菌液を濁度(OD600)が1.0になるように希釈した。この希釈菌液を、各種化合物を種々の濃度で含むYPT液体培地に培地容量の0.05%相当接種して $37^{\circ}\text{C}$ で振とう培養し、培養16時間後の濁度(OD600)を測定した。図4に示す構造の化合物は、化合物の水溶性が低く、 $0.1\sim 50\text{ppm}$ となる量を培地に添加しても上記大腸菌の増殖阻害が認められず、50%の増殖阻害の化合物濃度は算出できなかった。

【0030】

実施例7(lacリプレッサー遺伝子を導入したラットPPO遺伝子発現大腸菌BT3株の取得)

pBR322を制限酵素HindIIIおよび、AvaI(いずれも宝酒造社製)で切断し、約1.4kbの断片を回収した。また、pREP4を制限酵素HindIIIおよび、AvaI(いずれも宝酒造社製)で切断し、約2.4kbの断片を回収し、その5'末端を仔牛小腸アルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。

前述の2つのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて結合した。得られた反応液で大腸菌JM109のコンピテントセル(宝酒造社製)を形質転換して、カナマイシン・テトラサイクリン耐性となった株を選抜し、該カナマイシン・テトラサイクリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、lacリプレッサー発現用ベクターを取得した。該ベクターをBT3株に導入し、カナマイシン・テトラサイクリン耐性となった株を選抜した。さらに、該テトラサイクリン耐性株に実施例4で得た発現ベクターを導入し、カナマイシン

・テトラサイクリン・アンピシリン耐性となった株を選抜し、ラットPPO遺伝子ならびに、lacリプレッサー遺伝子が導入された大腸菌BT3株を取得した。

【0031】

実施例8 (lacリプレッサー遺伝子を導入したラットPPO遺伝子発現大腸菌BT3株を用いた化合物の活性阻害能の検定)

実施例7で得られたlacリプレッサー遺伝子を導入したラットPPO遺伝子発現大腸菌BT3株の終夜培養菌液を濁度(OD600)が0.5になるように希釈した。この希釈菌液を、各種化合物を種々の濃度で含むYPT液体培地に培地容量の0.1%相当接種して37℃で振とう培養し、培養20時間後の濁度(OD600)を測定した。化合物を添加しない系の濁度を100%として、図4に示す構造の化合物により50%増殖阻害の見られた濃度は、0.11ppmであった。

【0032】

実施例9 (コナミドリムシPPO DNA断片のクローニング)

コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) CC407 株を、Chlamydomonas Genetics Center (address: DCMB Group, Department of Botany, Box 91000, Duke University, Durham, NC 27708-1000, USA) より入手し、 $200 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{秒}$ の光合成活性照明下、7mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.4mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.34mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、25mM リン酸カリウム、0.5mM トリス (pH 7.5)、1ml/L ハトナー微量要素、および 1ml/L 氷酢酸からなる TAP 液体培地 (E. H. Harris, The Chlamydomonas Sourcebook, Academic Press, San Diego, 1989年、576-577頁) 中で5日間培養し、初期定常増殖期の細胞を含む培養液 200ml ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml) を得た。

この細胞から、ISOGEN (日本ジーン社) を用いて付属のマニュアルにしたがって操作を行ない、全 RNA を調製した。さらに、BioMag mRNA Purification Kit (パーセプティブバイオシステム社) を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、poly(A)RNA を分画した。得られた poly(A)RNA から、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech 社) を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない cDNA を合成し、ポリメラーゼチェーン反応の鋳型とした。

ポリメラーゼチェーン反応のプライマーとして、配列番号11および12で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを調製した。オリゴヌクレオチドはDNA

合成装置（PEアプライドシステムズ社：Model 394 DNA/RNA Synthesizer）を用い、合成用溶媒としてModel 394 DNA/RNA Synthesizer用溶媒（PEアプライドシステムズ社）を用い、DNA合成試薬としてアデニン、シトシン、グアニンおよびチミンに相当するフォスフォアミダイト試薬（PEアプライドシステムズ社）を用いて合成した。合成したオリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド精製用カートリッジ（PEアプライドシステムズ社：OPC カートリッジ）で精製したのち減圧乾燥しオリゴヌクレオチドを調製した。

ポリメラーゼチェーン反応は、Advantage cDNA PCR Kit（Clontech 社）を用いて付属のマニュアルに従って反応液を調製し、94℃ 1分間、次いで70℃ 4分間のサイクルを1回、94℃ 10秒間、次いで70℃ 4分間のサイクルを4回、94℃ 10秒間、次いで68℃ 4分間のサイクルを5回、94℃ 10秒間、次いで65℃ 5分間のサイクルを25回繰り返す条件で反応を行ない、反応液の一部をアガロース電気泳動にかけて、約2kbpの長さの増幅断片が得られることを確認した。さらに、MicroSpin S400HR カラム（Pharmacia Biotech社）を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない反応液中の余剰のプライマーを除去し、TA Cloning Kit（Invitrogen社）を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない増幅断片をpCR2.1プラスミドにクローニングした。

得られた組換えプラスミドが有するDNA断片の塩基配列をDye terminator cycle sequencing kit（PEアプライドバイオシステムズ社製）およびDNAシーケンサー373S（PEアプライドバイオシステムズ社製）を用い決定した。その結果、配列番号10で示される塩基配列が明らかとなり、遺伝子解析ソフト GENETYX（SDC 社）を用いた解析により、配列番号9で示されるアミノ酸配列をコードする完全長cDNAであることが判明した。

#### 【0033】

実施例10（コナミドリムシPPO遺伝子の大腸菌発現用ベクターの構築）

配列番号13で示される、末端に制限酵素 SacI の認識配列を導入した塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、および配列番号14で示される、末端に制限酵素 Sallの認識配列を導入した塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを調製した。オリゴヌクレオチドはDNA合成装置（PEアプライドシステムズ社：Model 394 DNA/RNA Synthesizer）を用い、合成用溶媒としてModel 394 DNA/RNA Synthesizer用溶媒（PEアプライドシステムズ社）を用い、DNA合成試薬としてアデニン、シトシン、グアニンおよびチミンに相当するフォスフォアミダイト試薬（PEアプライドシステムズ社）を用いて合成した。合成したオリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド精製用カートリッジ（PEアプライドシステムズ社：OPC カートリッジ）で精製したのち減圧乾燥しオリゴヌクレオチドを調製した。

実施例9で得られたコナミドリムシ由来のPPOをコードする全長遺伝子cDNAを鋳型とし、かつ、配列番号13及び配列番号14で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼチェーン反応を行い、PPOをコードする約2kbpのDNA断片を増幅した。ポリメラーゼチェーン反応における反応液は10pmolの配列番号13で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、10pmolの配列番号14で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、0.5  $\mu$ lのTaKaRa LATaq（宝酒造社製）、5.0  $\mu$ lの10x LA PCR buffer（宝酒造社製）、各々20 nmolの4種類の塩基（dATP、dCTP、dGTP、dTTP：Clontech社製）、及び、10ngの実施例9により得られたコナミドリムシPPOの全長cDNAを含むプラスミドを0.5ml容ポリメラーゼチェーン反应用チューブに採り、滅菌蒸留水を加えて全量を50  $\mu$ lとして調製した。ポリメラーゼチェーン反応における各工程は下記の条件で行った。変性工程は95℃で1分間保温し、アニーリング工程は55℃で2分間保温し、DNAポリメラーゼによる伸長工程は72℃で3分間保温する第1サイクルを1回行った後、変性工程は95℃で1分間保温し、アニーリング工程は55℃で1.5分間保温し、ポリメラーゼによる伸長工程は72℃で2分間保温する第2サイクルを34回行った。

ポリメラーゼチェーン反応終了後、反応液をMicroSpin S-400HR（ファルマシアバイオテク社製）で濾過することによりポリメラーゼチェーン反応によって増幅されたDNA断片を精製した。このDNA断片の末端を制限酵素 SacI および、Sall

で切断した。一方、プラスミド pUC118（宝酒造社製）を制限酵素 SacI および SalI（いずれも宝酒造社製）で切断し、5' 末端を仔牛小腸アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）で脱リン酸化した。

前述の2つのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて結合した。得られた反応液で大腸菌 JM109 のコンピテントセル（宝酒造社製）を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、コナミドリムシ PPO 遺伝子の大腸菌発現用ベクターを取得した。

#### 【0034】

実施例11（コナミドリムシ PPO 遺伝子による大腸菌 hemG 欠損株の相補性試験）

実施例10で得た発現ベクターを F. Yamamoto, H. Inokuchi, H. Ozeki, (1988年) Japanese Journal of Genetics, 63巻、237-249項等に記載されている PPO 遺伝子（hemG 遺伝子座）欠損突然変異系統大腸菌 BT3 株に導入し、カナマイシンを終濃度  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、アンピシリンを終濃度  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう含む LB 寒天培地に塗抹接種し、 $37^\circ\text{C}$  で2日間培養を行った。BT3 株は LB プレート上で生育不良となり小さなコロニーしか形成しなかったのに対し、コナミドリムシ PPO 遺伝子発現ベクターを導入した株では比較的大きなコロニーが形成された。

#### 【0035】

参考例1（直接導入用 PPO 遺伝子発現ベクターの構築）

ラット由来の PPO 遺伝子を植物細胞で発現させるために、植物直接導入用 PPO 遺伝子発現ベクターを構築する。

配列番号7および8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを調製する。オリゴヌクレオチドは DNA 合成装置（PE アプライドシステムズ社：Model 394 DNA/RNA Synthesizer）を用い、合成用溶媒として Model 394 DNA/RNA Synthesizer 用溶媒（PE アプライドシステムズ社）を用い、DNA 合成試薬としてアデニン、シトシン、グアニンおよびチミンに相当するフォスフォアミダイト試薬（PE アプライドシステムズ社）を用いて合成する。合成したオリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド精製用カートリッジ（PE アプライドシステムズ社：OPC カートリッジ）で精製したのち減圧乾燥しオリゴヌクレオチドを調製する。

実施例2により得られたラット由来の P P O の全長 cDNA を鋳型とし、かつ、配列番号7及び配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼチェーン反応を行い、ラット P P O をコードする約1.5kbpのDNA断片を増幅する。該ポリメラーゼチェーン反応は、0.2ml容ポリメラーゼチェーン反应用チューブに10pmolの配列番号7で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、10pmolの配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、0.5  $\mu$  l の Advantage KlenTaq Polymerase Mix (Clontech社製)、2.5  $\mu$  l の 10x KlenTaq PCR reaction buffer (Clontech社製)、各々5nmolの4種類の塩基 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP: Clontech社製)、及び、実施例2により得られたラット由来の P P O の全長 cDNA 10ng を加え、全量を25  $\mu$  l として行う。該ポリメラーゼチェーン反応における各工程は下記の条件で行う。変性工程は94℃で1分間保温し、アニーリング工程およびDNAポリメラーゼによる伸長工程は65℃で4分間保温する第1 サイクルを1回行った後、変性工程は94℃で30秒間保温し、アニーリング工程およびDNAポリメラーゼによる伸長工程は65℃で4分間保温する第2サイクルを15回行う。ポリメラーゼチェーン反応終了後、反応液をMicroSpin S-400HR (ファルマシアバイオテック社製) で濾過することによりポリメラーゼチェーン反応によって増幅されたDNA断片を精製する。このDNA断片の末端をDNAブランチングキット (宝酒造社製) を用いて平滑化した後、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) で5' 末端にリン酸基を付与する。

一方、pUC19由来のGUS発現ベクターpBI221 (Clontech社製) を制限酵素Sma I およびSacI (いずれも宝酒造社製) で切断し、GUS構造遺伝子を取り除いた2.8kbのDNA断片を回収し、末端をDNAブランチングキット (宝酒造社製) を用いて平滑末端化した後、バクテリアアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) で脱リン酸化する。

前述の2つのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて結合する。得られる反応液で大腸菌 HB101 のコンピテントセル (宝酒造社製) を形質転換しアンピシリン耐性となった株を選抜する。さらに、選抜された株に含有されるプラスミドのうちカリフラワーモザイクウイルス由来35Sプロモーター、ノバリンシンターゼ由来ターミネーターに対してラット

由来の P P O のコード領域が順方向に挿入されているプラスミドを選抜し植物直接導入用ラット P P O 遺伝子発現ベクターを得る。

【0036】

参考例2（間接導入用 P P O 遺伝子発現ベクターの構築）

ラット由来の P P O 遺伝子を植物細胞に導入して発現させるために、植物間接導入用 P P O 遺伝子発現ベクターを構築する。

配列番号7および8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを調製する。オリゴヌクレオチドはDNA合成装置（PEアプライドシステムズ社：Model 394 DNA/RNA Synthesizer）を用い、合成用溶媒としてModel 394 DNA/RNA Synthesizer用溶媒（PEアプライドシステムズ社）を用い、DNA合成試薬としてアデニン、シトシン、グアニンおよびチミンに相当するフォスフォアミダイト試薬（PEアプライドシステムズ社）を用いて合成する。合成したオリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド精製用カートリッジ（PEアプライドシステムズ社：OPC カートリッジ）で精製したのち減圧乾燥しオリゴヌクレオチドを調製する。

実施例2により得られたラット由来の P P O の全長cDNAを鋳型とし、配列番号7及び配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いてポリメラーゼチェーン反応を行い、ラット由来の P P O をコードする約1.5kbpのDNA断片を増幅する。該ポリメラーゼチェーン反応は、0.2ml容ポリメラーゼチェーン反応用チューブに10pmolの配列番号7で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、10pmolの配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、0.5  $\mu$  lのAdvantage KlenTaq Polymerase Mix（Clontech社製）、2.5  $\mu$  lの10x KlenTaq PCR reaction buffer（Clontech社製）、各々5nmolの4種類の塩基（dATP、dCTP、dGTP、dTTP：Clontech社製）、及び、実施例2により得られたラット由来の P P O の全長cDNAを含むDNA10ngを加え、全量を25  $\mu$  lとしポリメラーゼチェーン反応を行う。該ポリメラーゼチェーン反応における各工程は下記の条件で行う。変性工程は94℃で1分間保温し、アニーリング工程およびDNAポリメラーゼによる伸長工程は65℃で4分間保温する第1サイクルを1回行った後、変性工程は94℃で30秒間保温し、アニーリング工程およびDNAポリメラーゼによる伸長工程は65℃で4分間保温する第2サイクルを15回行う。ポリメラーゼチェーン反応終了後、反応

液をMicroSpin S-400HR（ファルマシアバイオテク社製）で濾過することによりポリメラーゼチェーン反応によって増幅されたDNA断片を精製する。このDNA断片の末端をDNAブランディングキット（宝酒造社製）を用いて平滑化した後、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）で5'末端にリン酸基を付与する。

一方、pBIN19由来のGUS発現バイナリーベクターpBI121（Clontech社製）を制限酵素Sma I、及び、SacI（いずれも宝酒造社製）で切断し、GUS構造遺伝子を取り除いたDNA断片を回収し、末端をDNAブランディングキット（宝酒造社製）を用いて平滑末端化した後、バクテリアアルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）で脱リン酸化する。

前述の2つのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて結合する。得られる反応液で大腸菌 HB101のコンピデントセル（宝酒造社製）を形質転換しアンピシリン耐性となった株を選抜する。さらに、選抜された株に含有されるプラスミドのうちカリフラワーモザイクウイルス由来35Sプロモーター、ノパリンシンターゼ由来ターミネーターに対してラット PPOのコード領域が順方向に挿入されているプラスミドを選抜し植物間接導入用ラット PPO遺伝子発現ベクターを得る。

#### 【0037】

#### 参考例3（コナミドリムシPPO遺伝子発現ベクターの構築）

コナミドリムシ由来のPPOを植物細胞で発現させるために、植物直接導入用PPO遺伝子発現ベクターを構築する。

実施例9で得られたコナミドリムシ由来PPO遺伝子 cDNA 増幅断片を持つ pCR2.1 プラスミドを、制限酵素 NotI および SpeI（いずれも宝酒造社製）で消化し、末端に NotI および SpeI の粘着末端を持つ長さ約 2kbp のコナミドリムシ由来PPO遺伝子 cDNA 断片を得る。一方、pBluescriptII KS+（Stratagene社製）を制限酵素 NotI および SpeI（いずれも宝酒造社製）で切断し、5'末端を仔牛小腸アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）で脱リン酸化する。ふたつのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて結合する。得られる反応液で大腸菌 HB101のコンピデントセル（宝酒造社製）を形質転換しアンピシリン耐性となった株を選抜する。さらに、選抜され



た株に含有されるプラスミドを選抜し、コナミドリムシ由来PPO遺伝子 cDNA 断片がプラスミドpBluescriptII KS+に挿入されているクローンを得る。

得られたプラスミドを制限酵素 BamHI および SacI (いずれも宝酒造社製) で消化し、末端に BamHI および SacI の粘着末端を持つ長さ約 2kbp のコナミドリムシ由来PPO遺伝子 cDNA 断片を得る。一方、pBI221 および pBI121 (いずれも Clontech 社製) を、それぞれ、制限酵素 BamHI および SacI (いずれも宝酒造社製) で切断し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を除いたベクター断片を得て、5' 末端を仔牛小腸アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) で脱リン酸化する。コナミドリムシ由来PPO遺伝子 cDNA 断片と、pBI221 あるいは pBI121 のベクター断片のふたつのDNA断片をマイクロチューブに採り、DNAライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて結合する。得られる反応液で大腸菌 HB101のコンピテントセル (宝酒造社製) を形質転換し、pBI221 ベクター断片とのライゲーションの場合にはアンピシリン耐性、pBI121 ベクター断片とのライゲーションの場合にはカナマイシン耐性となった株を選抜する。さらに、選抜された株に含有されるプラスミドを選抜し、コナミドリムシ由来PPO遺伝子 cDNA 断片が pBI221 ベクター断片に挿入された直接導入用プラスミド、あるいは pBI121 ベクター断片に挿入された間接導入用プラスミドを得る。

#### 【0038】

参考例4 (ラットまたはコナミドリムシ由来のPPO発現ベクター導入形質転換植物の作出)

参考例2または参考例3で得られる間接導入用ラットPPO遺伝子発現ベクターまたはコナミドリムシPPO遺伝子発現ベクターをバイナリーベクター法 (Clontech社製: GUS ジーンフュージョンシステム) により、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404に移す。この菌株を、植物遺伝子操作マニュアル (内宮著、講談社サイエンティフィック、1990年) に記載の方法に準じて、無菌培養したタバコ葉片に感染させ、形質転換タバコを得る。同様に、N.Pawlicki et al., (1992年) *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 第31巻、129-139頁に記載の方法に準じて、無菌培養したニンジン実生の葉柄に感染させ形質転換ニンジンを得る。同様に、J.Puonti-Kaerlas et al., (1990年) *Theoretical and Applied G*

enetics、第80巻、246-252頁に記載の方法に準じて、無菌的に発芽させたエンドウ実生の上胚軸または子葉に感染させ、形質転換エンドウを得る。

さらに、参考例1または参考例4で得られる直接導入用ラットPPO遺伝子発現ベクターまたはコナミドリムシPPO遺伝子発現ベクターを特開平3-291501に記載されている方法で、パーティクルガンによりダイズ不定胚に導入し、形質転換ダイズを得る。同様に、島田ら著、(1994年)育種学会雑誌、第44巻、別冊1号、66頁に記載の方法に準じて、パーティクルガンにより無菌培養したイネ未熟胚盤に導入し、形質転換イネを得る。同様に、宅見ら著、(1995年)育種学会雑誌、第44巻、別冊1号、57頁に記載されている通常の方法に準じて、パーティクルガンにより無菌培養したコムギ未熟胚盤に導入し、形質転換コムギを得る。同様に、萩尾ら著、(1995年)育種学会雑誌、第44巻、別冊1号、67頁に記載の方法に準じて、パーティクルガンにより無菌培養したオオムギ未熟胚盤に導入し、形質転換オオムギを得る。同様に、M.E. Fromm et al., (1990年) BIO/TECHNOLOGY、第8巻 833-839頁に記載の方法に準じて、パーティクルガンによりトウモロコシ不定胚に導入し、形質転換トウモロコシを得る。

#### 【0039】

##### 【発明の効果】

本発明により、化合物のPPO活性阻害能を簡便に評価する方法を提供することが可能となった。

#### 【0040】

##### 【配列の簡単な説明】

##### 1. 配列番号1：

ラット由来のPPO遺伝子のcDNAにコードされているミトコンドリア型PPOのアミノ酸配列を示す。

##### 2. 配列番号2：

ラット由来のPPO遺伝子のcDNAクローンの塩基配列を示す。

##### 3. 配列番号3：

ラット由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を含むDNA断片の増幅に用いるオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

4. 配列番号4 :

ラット由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を含むDNA断片の増幅に用いるオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号5 :

ラット由来のPPO遺伝子の大腸菌発現ベクターの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す。

6. 配列番号6 :

ラット由来のPPO遺伝子の大腸菌発現ベクターの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す。

配列番号7 :

直接導入用ラット由来PPO遺伝子発現ベクターおよび間接導入用ラット由来PPO発現ベクターの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す。

8. 配列番号8 :

直接導入用ラット由来PPO遺伝子発現ベクターおよび間接導入用ラット由来PPO発現ベクターの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す

9. 配列番号9 :

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子のcDNAにコードされているPPOのアミノ酸配列を示す。

10. 配列番号10 :

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子のcDNAクローンの塩基配列を示す。

11. 配列番号11 :

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子を含むDNA断片の増幅に用いるオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

12. 配列番号12 :

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子を含むDNA断片の増幅に用いるオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

13. 配列番号13 :

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子の発現ベクターの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す。

14. 配列番号 14 :

コナミドリムシ由来の PPO 遺伝子の大腸菌発現ベクターの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す。

【0041】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：477

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ラット

株名：Fisher 344

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..477

特徴を決定した方法：S

配列

Met	Ala	Arg	Thr	Val	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Ile	Ser	Gly	Leu	Ala
1				5				10					15		
Ala	Ser	Tyr	His	Leu	Thr	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Pro	Lys	Val	Ile	Leu
			20					25					30		
Val	Glu	Gly	Ser	Lys	Arg	Leu	Gly	Gly	Trp	Ile	Arg	Ser	Val	Arg	Gly
			35					40					45		
Ser	Asp	Gly	Ala	Ile	Phe	Glu	Leu	Gly	Pro	Arg	Gly	Ile	Arg	Pro	Ala
	50					55						60			
Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Gly	Leu
65					70					75				80	
Glu	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Val	Arg	Gly	Asp	His	Pro	Ala	Ala	Gln	Asn
			85							90				95	
Arg	Phe	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	His	Pro	Leu	Pro	Ser	Gly	Leu
				100				105						110	

Arg Gly Leu Leu Arg Pro Ser Pro Pro Phe Ser Lys Pro Leu Phe Trp			
115	120	125	
Ala Gly Leu Arg Glu Leu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Glu Pro Asp Glu			
130	135	140	
Thr Val His Ser Phe Ala Gln Arg Arg Leu Gly Pro Glu Val Ala Ser			
145	150	155	160
Leu Ala Met Asp Ser Leu Cys Arg Gly Val Phe Ala Gly Asn Ser Gln			
165	170	175	
Glu Leu Ser Ile Arg Ser Cys Phe Pro Ser Leu Phe Gln Ala Glu Gln			
180	185	190	
Thr His Gly Ser Met Leu Leu Gly Leu Leu Leu Gly Ala Gly Gln Thr			
195	200	205	
Pro Gln Pro Asn Ser Ser Leu Ile Arg Gln Ala Arg Ala Glu Arg Trp			
210	215	220	
Ser Gln Trp Ser Leu Arg Gly Gly Leu Glu Met Leu Pro Gln Ala Leu			
225	230	235	240
His Asn Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Val Thr Ile Leu Ser Gly Gln Pro			
245	250	255	
Ala Cys Gly Leu Ser Leu Gln Pro Glu Gly His Trp Lys Val Ser Leu			
260	265	270	
Gly Asp Ser Ser Leu Glu Ala Asp His Ile Ile Ser Thr Ile Pro Ala			
275	280	285	
Ser Val Leu Ser Lys Leu Leu Pro Ala Glu Ala Ala Pro Leu Ala His			
290	295	300	
Ile Leu Ser Thr Ile Gln Ala Val Ser Val Ala Val Val Asn Leu Gln			
305	310	315	320
Tyr Lys Gly Ala Cys Leu Pro Val Gln Gly Phe Gly His Leu Val Pro			
325	330	335	
Ser Ser Glu Asp Pro Thr Val Leu Gly Ile Val Tyr Asp Ser Val Ala			

340	345	350	
Phe Pro Glu Gln Asp Gly Asn Pro Pro Gly Leu Arg Leu Thr Val Met			
355	360	365	
Leu Gly Gly Tyr Trp Leu Gln Lys Leu Lys Ala Asn Gly His Glu Leu			
370	375	380	
Ser Pro Glu Leu Phe Gln Arg Ala Ala Gln Glu Ala Ala Ala Thr Gln			
385	390	395	400
Leu Gly Leu Lys Glu Gln Pro Ser His Cys Leu Val His Leu His Lys			
405	410	415	
Asn Cys Ile Pro Gln Tyr Thr Leu Gly His Trp Gln Lys Leu Asp Ser			
420	425	430	
Ala Leu Gln Phe Leu Thr Ala Gln Arg Leu Pro Leu Thr Leu Ala Gly			
435	440	445	
Ala Ser Tyr Glu Gly Val Ala Val Asn Asp Cys Ile Glu Ser Gly Arg			
450	455	460	
Gln Ala Ala Ile Ala Val Leu Gly Thr Glu Ser Asn Ser			
465	470	475	

【0042】

配列番号 : 2

配列の長さ : 1638

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ラット

株名 : Fisher 344

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 143..1576

特徴を決定した方法：S

配列

CGTACACGCG CGTTTTGCAT TAGTTGCTCA TTAATCAGTA AGTGCCCAGA GGTGGGGTAC	60
GGGACCCGTG GGGTTTCTGC AGTTGTAAAG CAGGGTGCCT CCCGTTCTCC TGGGGTATCT	120
CGACTTTCCC CCAGGCCTTA CG ATG GCC CGG ACT GTG ATA GTG CTT GGC GGA	172
Met Ala Arg Thr Val Ile Val Leu Gly Gly	
1 5 10	
GGT ATC AGC GGA TTG GCC GCA AGT TAT CAT CTG ACC CGA AGC CCC AGT	220
Gly Ile Ser Gly Leu Ala Ala Ser Tyr His Leu Thr Arg Ser Pro Ser	
15 20 25	
CCT CCT AAG GTG ATC TTA GTG GAG GGC AGC AAA CGT TTG GGA GGC TGG	268
Pro Pro Lys Val Ile Leu Val Glu Gly Ser Lys Arg Leu Gly Gly Trp	
30 35 40	
ATC CGT TCA GTC CGA GGA TCA GAT GGT GCG ATC TTT GAA CTT GGA CCT	316
Ile Arg Ser Val Arg Gly Ser Asp Gly Ala Ile Phe Glu Leu Gly Pro	
45 50 55	
CGA GGA ATT AGG CCG GCT GGA GCC CTG GGA GCC CGG ACC CTG CTC CTG	364
Arg Gly Ile Arg Pro Ala Gly Ala Leu Gly Ala Arg Thr Leu Leu Leu	
60 65 70	
GTT TCT GAA CTT GGC TTG GAA TCC GAA GTC TTG CCT GTC CGA GGG GAT	412
Val Ser Glu Leu Gly Leu Glu Ser Glu Val Leu Pro Val Arg Gly Asp	
75 80 85 90	
CAT CCA GCT GCC CAG AAC CGG TTC CTG TAT GTA GGC GGT GCC CTG CAC	460
His Pro Ala Ala Gln Asn Arg Phe Leu Tyr Val Gly Gly Ala Leu His	
95 100 105	
CCC CTA CCC TCT GGC CTC AGG GGG CTA CTT CGT CCT TCA CCC CCC TTC	508
Pro Leu Pro Ser Gly Leu Arg Gly Leu Leu Arg Pro Ser Pro Pro Phe	
110 115 120	
TCA AAA CCT CTA TTT TGG GCT GGA CTG AGG GAG TTG ACG AAG CCC AGG	556



Ser Lys Pro Leu Phe Trp Ala Gly Leu Arg Glu Leu Thr Lys Pro Arg	
125 130 135	
GGC AAA GAG CCT GAT GAG ACT GTG CAC AGT TTT GCC CAG CGC CGC CTT	604
Gly Lys Glu Pro Asp Glu Thr Val His Ser Phe Ala Gln Arg Arg Leu	
140 145 150	
GGA CCT GAG GTG GCG TCT CTG GCT ATG GAC AGC CTT TGC AGA GGA GTG	652
Gly Pro Glu Val Ala Ser Leu Ala Met Asp Ser Leu Cys Arg Gly Val	
155 160 165 170	
TTT GCT GGC AAC AGC CAA GAG CTC AGC ATC CGG TCC TGC TTT CCC AGT	700
Phe Ala Gly Asn Ser Gln Glu Leu Ser Ile Arg Ser Cys Phe Pro Ser	
175 180 185	
CTC TTC CAA GCT GAA CAA ACC CAC GGG TCC ATG TTA CTG GGG CTG CTG	748
Leu Phe Gln Ala Glu Gln Thr His Gly Ser Met Leu Leu Gly Leu Leu	
190 195 200	
CTG GGG GCA GGG CAA ACT CCA CAG CCC AAT TCC TCA TTA ATT CGT CAG	796
Leu Gly Ala Gly Gln Thr Pro Gln Pro Asn Ser Ser Leu Ile Arg Gln	
205 210 215	
GCC CGC GCT GAG CGA TGG AGT CAG TGG TCA CTC CGT GGA GGG CTG GAG	844
Ala Arg Ala Glu Arg Trp Ser Gln Trp Ser Leu Arg Gly Gly Leu Glu	
220 225 230	
ATG TTG CCC CAG GCC CTT CAT AAC TAC CTA ACA AGT AAA GGG GTC ACT	892
Met Leu Pro Gln Ala Leu His Asn Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Val Thr	
235 240 245 250	
ATC CTC AGT GGT CAG CCA GCC TGC GGG CTC AGC CTT CAG CCA GAA GGG	940
Ile Leu Ser Gly Gln Pro Ala Cys Gly Leu Ser Leu Gln Pro Glu Gly	
255 260 265	
CAC TGG AAG GTG TCT CTA GGG GAC AGC AGT CTG GAG GCT GAC CAC ATT	988
His Trp Lys Val Ser Leu Gly Asp Ser Ser Leu Glu Ala Asp His Ile	
270 275 280	

ATA AGC ACC ATT CCA GCT TCA GTG CTC AGC AAG CTG CTC CCT GCC GAG	1036
Ile Ser Thr Ile Pro Ala Ser Val Leu Ser Lys Leu Leu Pro Ala Glu	
285 290 295	
GCT GCA CCT CTG GCT CAC ATC CTG AGT ACC ATC CAA GCT GTG TCT GTG	1084
Ala Ala Pro Leu Ala His Ile Leu Ser Thr Ile Gln Ala Val Ser Val	
300 305 310	
GCC GTG GTG AAT CTG CAG TAC AAA GGA GCT TGT CTG CCT GTG CAG GGA	1132
Ala Val Val Asn Leu Gln Tyr Lys Gly Ala Cys Leu Pro Val Gln Gly	
315 320 325 330	
TTT GGA CAT CTG GTG CCA TCC TCA GAA GAC CCG ACC GTC CTG GGA ATC	1180
Phe Gly His Leu Val Pro Ser Ser Glu Asp Pro Thr Val Leu Gly Ile	
335 340 345	
GTG TAT GAC TCG GTT GCT TTT CCT GAG CAG GAT GGG AAC CCC CCA GGC	1228
Val Tyr Asp Ser Val Ala Phe Pro Glu Gln Asp Gly Asn Pro Pro Gly	
350 355 360	
CTC AGA CTG ACT GTG ATG TTG GGA GGT TAC TGG TTA CAG AAG CTG AAA	1276
Leu Arg Leu Thr Val Met Leu Gly Gly Tyr Trp Leu Gln Lys Leu Lys	
365 370 375	
GCC AAT GGC CAT GAA TTG TCT CCA GAG CTA TTC CAA CGA GCA GCA CAG	1324
Ala Asn Gly His Glu Leu Ser Pro Glu Leu Phe Gln Arg Ala Ala Gln	
380 385 390	
GAA GCG GCT GCC ACA CAG TTA GGA CTG AAA GAG CAA CCA AGC CAT TGC	1372
Glu Ala Ala Ala Thr Gln Leu Gly Leu Lys Glu Gln Pro Ser His Cys	
395 400 405 410	
TTG GTC CAT CTA CAC AAA AAC TGT ATC CCT CAG TAT ACA CTA GGC CAC	1420
Leu Val His Leu His Lys Asn Cys Ile Pro Gln Tyr Thr Leu Gly His	
415 420 425	
TGG CAA AAA CTA GAC TCA GCT CTG CAA TTC CTG ACG GCC CAG AGG TTG	1468
Trp Gln Lys Leu Asp Ser Ala Leu Gln Phe Leu Thr Ala Gln Arg Leu	

430	435	440	
CCC CTG ACT TTG GCT GGG GCC TCC TAT GAG GGG GTA GCT GTC AAT GAC			1516
Pro Leu Thr Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Glu Gly Val Ala Val Asn Asp			
445	450	455	
TGT ATA GAG AGT GGG CGC CAG GCA GCA ATT GCT GTC CTG GGC ACA GAA			1564
Cys Ile Glu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ile Ala Val Leu Gly Thr Glu			
460	465	470	
TCG AAC AGC TGA CCCCCACTCT CCTACTCATG AAAGTAAAAG TTGATGGAGC			1614
Ser Asn Ser			
475			
TTGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA			1636

【0043】

配列番号：3

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

TTTGCAGAGG AGTGTTTGCT GGCAACAG 28

【0044】

配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

AGCCGCTTCC TGTGCTGCTC GTTGGAATA 29

【0045】

配列番号：5

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸（合成オリゴヌクレオチド）

配列

AGGCCTTACC GCGGCCCGGA CTGTG 25

【0046】

配列番号：6

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸（合成オリゴヌクレオチド）

配列

TAGGAGAGCC CGGGTCAGAT GTTCG 25

【0047】

配列番号：7

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸（合成オリゴヌクレオチド）

配列

ATGGCCCGGA CTGTGATAGT GCTTG 25

【0048】

配列番号：8

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸（合成オリゴヌクレオチド）

配列

TTCATGAGTA GGAGAGTGGG GGTCA 25

【0049】

配列番号 : 9

配列の長さ : 563

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : コナミドリムシ

株名 : CC-407

配列

Met	Met	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Ser	Ser	Arg	Arg
1				5					10					15	
Ser	Gln	Ile	Arg	Ser	Ala	Ala	His	Val	Ser	Ala	Lys	Val	Ala	Pro	Arg
			20					25					30		
Pro	Thr	Pro	Phe	Ser	Val	Ala	Ser	Pro	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala
		35					40					45			
Thr	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Thr	Leu	His	Arg	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr
	50					55				60					
Gly	Ala	Pro	Thr	Ala	Ser	Gly	Ala	Gly	Val	Ala	Lys	Thr	Leu	Asp	Asn
65				70					75				80		
Val	Tyr	Asp	Val	Ile	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Leu	Val	Thr
			85					90					95		
Gly	Gln	Ala	Leu	Ala	Ala	Gln	His	Lys	Ile	Gln	Asn	Phe	Leu	Val	Thr
		100					105						110		
Glu	Ala	Arg	Glu	Arg	Val	Gly	Gly	Asn	Ile	Thr	Ser	Met	Ser	Gly	Asp
		115					120					125			
Gly	Tyr	Val	Trp	Glu	Glu	Gly	Pro	Asn	Ser	Phe	Gln	Pro	Asn	Asp	Ser
	130						135					140			

Met Leu Gln Ile Ala Val Asp Ser Gly Cys Glu Lys Asp Leu Val Phe			
145	150	155	160
Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Trp Trp Glu Gly Lys Leu Arg			
	165	170	175
Pro Val Pro Ser Gly Leu Asp Ala Phe Thr Phe Asp Leu Met Ser Ile			
	180	185	190
Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ile Asn Gly			
	195	200	205
Ala Met Pro Ser Phe Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Ile Arg Arg Asn			
	210	215	220
Leu Gly Asp Glu Val Phe Phe Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly			
225	230	235	240
Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Asn			
	245	250	255
Arg Ile Trp Ile Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Leu Val Gly Gly Ala			
	260	265	270
Ile Lys Leu Phe Gln Glu Arg Gln Ser Asn Pro Ala Pro Pro Arg Asp			
	275	280	285
Pro Arg Leu Pro Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg			
	290	295	300
Lys Gly Leu Lys Met Leu Pro Asp Ala Ile Glu Arg Asn Ile Pro Asp			
305	310	315	320
Lys Ile Arg Val Asn Trp Lys Leu Val Ser Leu Gly Arg Glu Ala Asp			
	325	330	335
Gly Arg Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Pro Glu Gly Arg Val Lys Val			
	340	345	350
Phe Ala Arg Ala Val Ala Leu Thr Ala Pro Ser Tyr Val Val Ala Asp			
	355	360	365
Leu Val Lys Glu Gln Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ser Phe			

370	375	380	
Asp Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Ser Ala			
385	390	395	400
Val Arg Glu Glu Arg Lys Ala Ser Asp Gly Ser Val Pro Gly Phe Gly			
405	410	415	
Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Ile Thr Thr Leu Gly Thr Ile Tyr			
420	425	430	
Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Glu Gly His Met Leu Leu			
435	440	445	
Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Asn Arg Gly Ile Val Asn Gln Thr			
450	455	460	
Thr Glu Gln Leu Val Glu Gln Val Asp Lys Asp Leu Arg Asn Met Val			
465	470	475	480
Ile Lys Pro Asp Ala Pro Lys Pro Arg Val Val Gly Val Arg Val Trp			
485	490	495	
Pro Arg Ala Ile Pro Gln Phe Asn Leu Gly His Leu Glu Gln Leu Asp			
500	505	510	
Lys Ala Arg Lys Ala Leu Asp Ala Ala Gly Leu Gln Gly Val His Leu			
515	520	525	
Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Lys Val Val Glu His			
530	535	540	
Gly Tyr Glu Ser Ala Ala Asn Leu Ala Lys Ser Val Ser Lys Ala Ala			
545	550	555	560
Val Lys Ala			

563

【0050】

配列番号 : 10

配列の長さ : 1838

配列の型 : 核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：コナミドリムシ

株名：CC-407

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：2..1793

特徴を決定した方法：S

配列

A ATG ATG TTG ACC CAG ACT CCT GGG ACC GCC ACG GCT TCT AGC CGG 46

Met Met Leu Thr Gln Thr Pro Gly Thr Ala Thr Ala Ser Ser Arg

1

5

10

15

CGG TCG CAG ATC CGC TCG GCT GCG CAC GTC TCC GCC AAG GTC GCG CCT 94



Arg Ser Gln Ile Arg Ser Ala Ala His Val Ser Ala Lys Val Ala Pro	
20 25 30	
CGG CCC ACG CCA TTC TCG GTC GCG AGC CCC GCG ACC GCT GCG AGC CCC	142
Arg Pro Thr Pro Phe Ser Val Ala Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ser Pro	
35 40 45	
GCG ACC GCG GCG GCC CGC CGC ACA CTC CAC CGC ACT GCT GCG GCG GCC	190
Ala Thr Ala Ala Ala Arg Arg Thr Leu His Arg Thr Ala Ala Ala Ala	
50 55 60	
ACT GGT GCT CCC ACG GCG TCC GGA GCC GGC GTC GCC AAG ACG CTC GAC	238
Thr Gly Ala Pro Thr Ala Ser Gly Ala Gly Val Ala Lys Thr Leu Asp	
65 70 75	
AAT GTG TAT GAC GTG ATC GTG GTC GGT GGA GGT CTC TCG GGC CTG GTG	286
Asn Val Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu Val	
80 85 90 95	
ACC GGC CAG GCC CTG GCG GCT CAG CAC AAA ATT CAG AAC TTC CTT GTT	334
Thr Gly Gln Ala Leu Ala Ala Gln His Lys Ile Gln Asn Phe Leu Val	
100 105 110	
ACG GAG GCT CGC GAG CGC GTC GGC GGC AAC ATT ACG TCC ATG TCG GGC	382
Thr Glu Ala Arg Glu Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Met Ser Gly	
115 120 125	
GAT GGC TAC GTG TGG GAG GAG GGC CCG AAC AGC TTC CAG CCC AAC GAT	430
Asp Gly Tyr Val Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp	
130 135 140	
AGC ATG CTG CAG ATT GCG GTG GAC TCT GGC TGC GAG AAG GAC CTT GTG	478
Ser Met Leu Gln Ile Ala Val Asp Ser Gly Cys Glu Lys Asp Leu Val	
145 150 155	
TTC GGT GAC CCC ACG GCT CCC CGC TTC GTG TGG TGG GAG GGC AAG CTG	526
Phe Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Trp Trp Glu Gly Lys Leu	
160 165 170 175	

CGC CCC GTG CCC TCG GGC CTG GAC GCC TTC ACC TTC GAC CTC ATG TCC	574
Arg Pro Val Pro Ser Gly Leu Asp Ala Phe Thr Phe Asp Leu Met Ser	
180 185 190	
ATC CCC GGC AAG ATC CGC GCC GGG CTG GGC GCC ATC GGC CTC ATC AAC	622
Ile Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ile Asn	
195 200 205	
GGA GCC ATG CCC TCC TTC GAG GAG AGT GTG GAG CAG TTC ATC CGC CGC	670
Gly Ala Met Pro Ser Phe Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Ile Arg Arg	
210 215 220	
AAC CTG GGC GAT GAG GTG TTC TTC CGC CTG ATC GAG CCC TTC TGC TCC	718
Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Phe Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser	
225 230 235	
GGC GTG TAC GCG GGC GAC CCC TCC AAG CTG TCC ATG AAG GCG GCC TTC	766
Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe	
240 245 250 255	
AAC AGG ATC TGG ATT CTG GAG AAG AAC GGC GGC AGC CTG GTG GGA GGT	814
Asn Arg Ile Trp Ile Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Leu Val Gly Gly	
260 265 270	
GCC ATC AAG CTG TTC CAG GAA CGC CAG TCC AAC CCG GCC CCG CCG CGG	862
Ala Ile Lys Leu Phe Gln Glu Arg Gln Ser Asn Pro Ala Pro Pro Arg	
275 280 285	
GAC CCG CGC CTG CCG CCC AAG CCC AAG GGC CAG ACG GTG GGC TCG TTC	910
Asp Pro Arg Leu Pro Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe	
290 295 300	
CGC AAG GGC CTG AAG ATG CTG CCG GAC GCC ATT GAG CGC AAC ATC CCC	958
Arg Lys Gly Leu Lys Met Leu Pro Asp Ala Ile Glu Arg Asn Ile Pro	
305 310 315	
GAC AAG ATC CGC GTG AAC TGG AAG CTG GTG TCT CTG GGC CGC GAG GCG	1006
Asp Lys Ile Arg Val Asn Trp Lys Leu Val Ser Leu Gly Arg Glu Ala	

320	325	330	335	
GAC GGG CGG TAC GGG CTG GTG TAC GAC ACG CCC GAG GGC CGT GTC AAG				1054
Asp Gly Arg Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Pro Glu Gly Arg Val Lys				
	340	345	350	
GTG TTT GCC CGC GCC GTG GCT CTG ACC GCG CCC AGC TAC GTG GTG GCG				1102
Val Phe Ala Arg Ala Val Ala Leu Thr Ala Pro Ser Tyr Val Val Ala				
	355	360	365	
GAC CTG GTC AAG GAG CAG GCG CCC GCC GCC GAG GCC CTG GGC TCC				1150
Asp Leu Val Lys Glu Gln Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ser				
	370	375	380	
TTC GAC TAC CCG CCG GTG GGC GCC GTG ACG CTG TCG TAC CCG CTG AGC				1198
Phe Asp Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Ser				
	385	390	395	
GCC GTG CGG GAG GAG CGC AAG GCC TCG GAC GGG TCC GTG CCG GGC TTC				1246
Ala Val Arg Glu Glu Arg Lys Ala Ser Asp Gly Ser Val Pro Gly Phe				
400	405	410	415	
GGT CAG CTG CAC CCG CGC ACG CAG GGC ATC ACC ACT CTG GGC ACC ATC				1294
Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Ile Thr Thr Leu Gly Thr Ile				
	420	425	430	
TAC AGC TCC AGC CTG TTC CCC GGC CGC GCG CCC GAG GGC CAC ATG CTG				1342
Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Glu Gly His Met Leu				
	435	440	445	
CTG CTC AAC TAC ATC GGC GGC ACC ACC AAC CGC GGC ATC GTC AAC CAG				1390
Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Asn Arg Gly Ile Val Asn Gln				
	450	455	460	
ACC ACC GAG CAG CTG GTG GAG CAG GTG GAC AAG GAC CTG CGC AAC ATG				1438
Thr Thr Glu Gln Leu Val Glu Gln Val Asp Lys Asp Leu Arg Asn Met				
	465	470	475	
GTC ATC AAG CCC GAC GCG CCC AAG CCC CGT GTG GTG GGC GTG CGC GTG				1486

[illegible]

【0051】

配列番号：11

配列の長さ : 28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

AATGATGTTG ACCCAGACTC CTGGGACC 28

【 0 0 5 2 】

配列番号：12

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

TACTACACAT CCCAGCAAGC GCCAATG 27

【0053】

配列番号：13

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

TCGAGCTCAA TGATGTTGAC CCAGACTCCT GG 32

【0054】

配列番号：14

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

TTGTCGACTA CTACACATCC CAGCAAGCGC CA 32

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

ラット由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNA全長を含有するベクターの構築方法を示す。

「PP0 fragment 1」は実施例2のポリメラーゼチェーン反応により得られたDNA断片を、「PP0 fragment 2」は実施例1で得られたクローンが有するDNA断片を、

「PP0」はラット由来プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNAを示し、その他の記号は制限酵素認識部位を示す。

【図2】

ラット由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを大腸菌に導入して発現させるために構築されるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ発現ベクターの構築方法を示す。

「PP0」はラット由来プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNAを、「lacZ」はベクターガラクトシダーゼ遺伝子を示し、その他の記号は制限酵素認識部位を示す。

【図3】

lacリプレッサーを大腸菌に導入して発現させるために構築されるlacリプレッサー発現ベクターの構築方法を示す。

「lac repr.」はlacリプレッサー遺伝子を、「Tet」はテトラサイクリン耐性遺伝子を、その他の記号は制限酵素認識部位を示す。

【図4】

ラットプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に対する化合物の阻害能試験に供した化合物の構造を示す。

【図5】

ラット由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを植物細胞に導入して発現させるために構築される直接導入用プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ発現ベクターの構築方法を示す。

「35S」はカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーターを、「NOS」はアグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼターミネーターを、「PP0」はラット由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNAを、その他の記号は制限酵素認識部位を示す。

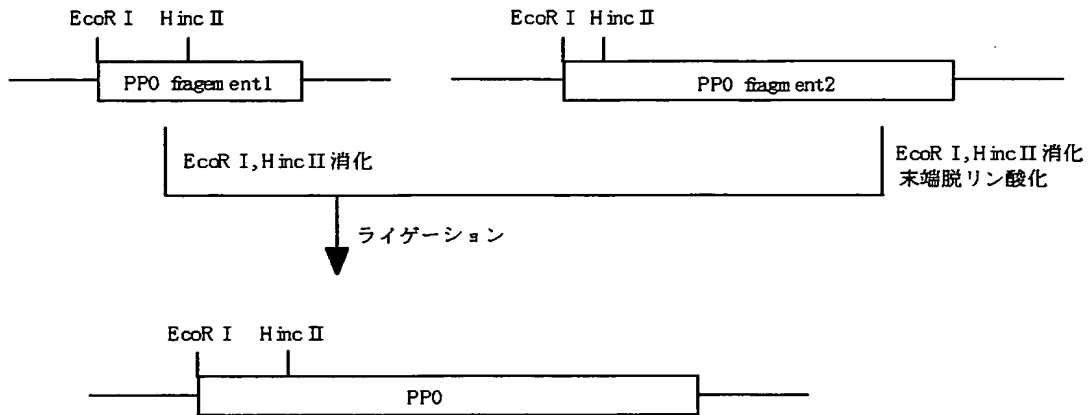
【図6】

ラット由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを植物細胞に導入して発現させるために構築される間接導入用プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ発現ベクターの構築方法を示す。

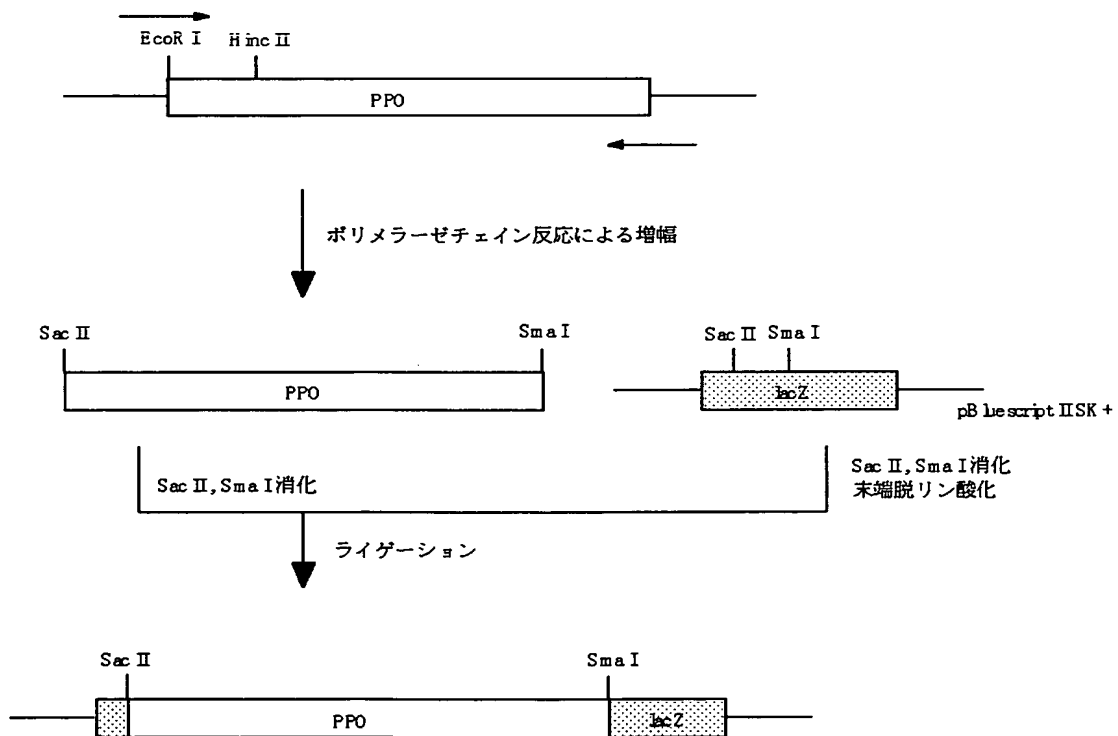
「35S」はカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーターを、「NOS」はアグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼターミネーターを、「PPO」はラット由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNAを、「NTPII」はカナマイシン耐性遺伝子を、「NOSp」はアグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼプロモーターを、「LB」および「RB」はそれぞれアグロバクテリウムT-DNA由来の左端境界塩基配列および右端境界塩基配列を、その他の記号は制限酵素認識部位を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

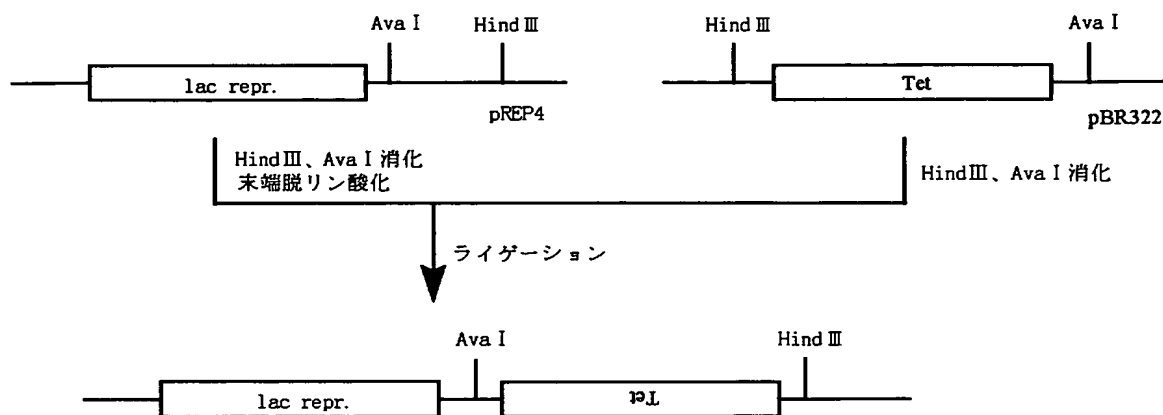


【図 2】

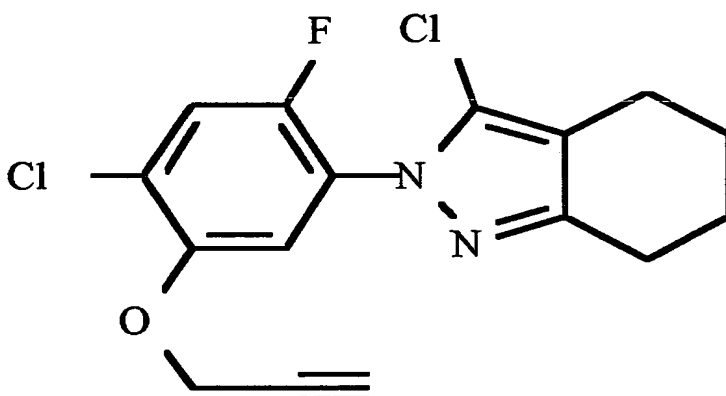




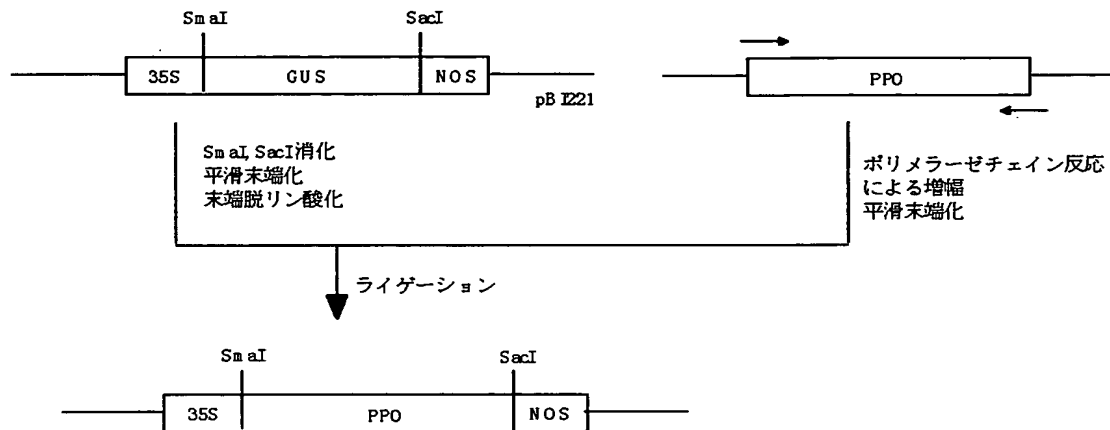
【図 3】



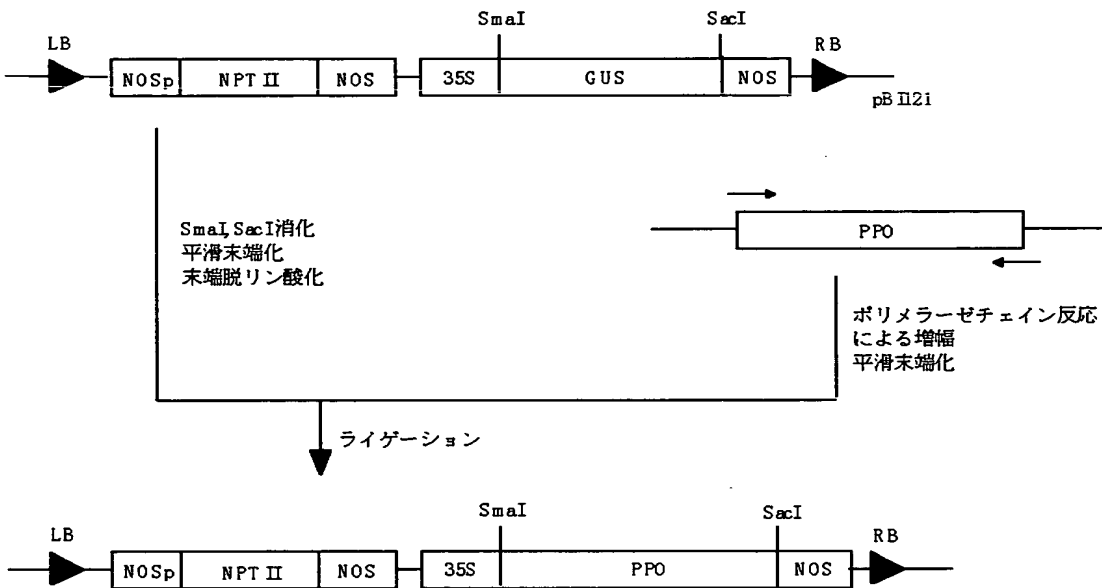
【図 4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を簡便に評価する方法を提供すること。

【解決手段】

化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を評価する方法であって、

(1) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に基づく増殖能の欠損した宿主細胞に、宿主細胞内で機能可能なプロモーター、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子、および宿主細胞内で機能可能なターミネーターが機能可能な形で結合されてなるDNA断片が導入されてなり、前記DNA断片に在するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を発現する形質転換体を、

被験化合物の存在下及び非存在下に、プロトヘムまたはその誘導体を含まない培地で培養して各条件下における該形質転換体の増殖度を測定する工程、

(2) 該増殖度の差異に基づき被験化合物の接触による前記形質転換体の増殖阻害度を求め、被験化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を判定する工程、

を含むことを特徴とする化合物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能の評価方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000002093  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100093285  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内  
【氏名又は名称】 久保山 隆  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100094477  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内  
【氏名又は名称】 神野 直美

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
氏 名	住友化学工業株式会社